

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktorin: Frau Prof. Dr. G.E.F. Nöldge-Schomburg

**Der Poly(ADP)-Ribose-Polymerase-Inhibitor INO-1001
reduziert den Reperfusionsschaden der Leber nach
hämorrhagischem Schock und Reperfusion
- Untersuchungen am akut instrumentierten Hausschwein.**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Stephan Quest
aus Rostock

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Schareck

1. Gutachter: PD Dr. med. habil J. P. Roesner, Universität Rostock

2. Gutachter: PD Dr. med. C. M. Bünger, Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. Dr. med. K. Zacharowski, FRCA, Universität Frankfurt a. M.

Datum der Verteidigung: 07.12.2011

Inhaltsverzeichnis

1	EINFÜHRUNG	5
1.1	PROBLEMSTELLUNG	5
1.2	HÄMORRHAGISCHER SCHOCK	6
1.3	REPERFUSIONSSCHADEN	8
1.3.1	Folgen des hämorrhagischen Schocks für die Leber	13
1.4	MIKROSKOPISCHE ANATOMIE DER LEBER	14
1.5	GEFÄßVERSORGUNG DER LEBER	15
1.6	POLY(ADP-RIBOSE)-POLYMERASE	17
1.6.1	PARP-Inhibitoren	20
1.7	ZIELSTELLUNG	21
2	MATERIAL UND METHODIK	22
2.1	VERSUCHSGENEHMIGUNG	22
2.2	TIERE	22
2.3	ANÄSTHESIE	22
2.3.1	Prämedikation und Narkose	22
2.3.2	Beatmung	23
2.3.3	Volumenmanagement	23
2.3.4	Extraabdominale Gefäße	23
2.3.5	Abdomenpräparation	25
2.3.6	Arteria hepatica propria	25
2.3.7	Portalvene	25
2.3.8	Katheterisierung der Vena hepatica	26
2.4	MESSMETHODEN	27
2.4.1	Herzfrequenz	27
2.4.2	Herzzeitvolumen	27
2.4.3	Intravasale Druckmessung	27
2.4.4	Blutflussmessung	27
2.4.5	Blutvoluminamessung	28
2.4.6	Blutgase	28
2.4.7	Gewebesauerstoffpartialdruck	28
2.4.8	Klinische Chemie	29
2.4.9	Histologie	29
2.4.10	PARP-Färbung	30
2.5	STUDIENPROTOKOLL	30
2.6	DATENVERARBEITUNG UND STATISTISCHE METHODEN	32
3	ERGEBNISSE	33
3.1	HERZFREQUENZ	33
3.2	MITTLERER ARTERIELLER BLUTDRUCK	34
3.3	HERZZEITVOLUMEN	34
3.4	INTRATHORAKALER BLUTVOLUMENINDEX	35
3.5	ENTNOMMENE BLUTMENGE	36
3.6	HÄMOGLOBIN	37
3.7	ARTERIELLER SAUERSTOFFPARTIALDRUCK	37
3.8	ARTERIELLER KOHLENDIOXIDPARTIALDRUCK	37
3.9	BLUTFLÜSSE IN DER ARTERIA HEPATICA UND VENA PORTAE	38

3.9.1	Blutfluss in der Arteria hepatica	38
3.9.2	Blutfluss in der Vena portae	39
3.9.3	Gesamter hepatischer Blutfluss.....	40
3.10	SAUERSTOFFANGEBOT DER LEBER.....	41
3.10.1	Arteria hepatica	41
3.10.2	Vena portae	41
3.10.3	Gesamtes Sauerstoffangebot in der Leber	42
3.11	SAUERSTOFFVERBRAUCH DER LEBER	43
3.12	OBERFLÄCHENOXYGENIERUNG DER LEBER	44
3.13	ASPARTAT-AMINOTRANSFERASE KONZENTRATION	45
3.14	LAKTAT-KONZENTRATION.....	46
3.15	HISTOLOGIE	46
4	DISKUSSION	49
4.1	DISKUSSION DER METHODEN.....	49
4.1.1	Experimentelles Modell	49
4.1.1.1	Tierspezies	49
4.1.1.2	Anästhesie	49
4.1.1.3	Beatmung	51
4.1.1.4	Präparation	51
4.1.2	Messmethoden	52
4.1.2.1	Herzzeitvolumen	52
4.1.2.2	Blutflussmessung	52
4.1.2.3	Oberflächen-pO ₂ -Messung	52
4.1.2.4	Laborparameter	54
4.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	55
4.2.1	Systemische hämodynamische Parameter	55
4.2.2	Entnommene Blutmenge und Volumensubstitution	56
4.2.3	Leberblutflüsse.....	56
4.2.4	Leberoberflächenoxygenierung	57
4.2.5	Leberenzymaktivität	59
4.2.6	Laktatkonzentration	59
4.2.7	Histologie	60
5	ZUSAMMENFASSUNG	61
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	62
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	63
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	65
9	CURRICULUM VITAE.....	75
10	THESEN ZUR PROMOTIONSSCHRIFT	76

1 Einführung

1.1 Problemstellung

Minderperfusion und damit verbundene Oxygenierungsstörungen des Splanchnikusgebietes werden als Ursachen für peri- und postoperative sowie posttraumatische Organdysfunktionen angesehen. Dabei nehmen die Organe des Splanchnikusgebietes, insbesondere Leber und Dünndarm, eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung einer generalisierten Entzündungsreaktion des Körpers, dem „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) bzw. der Sepsis und dem sich daraus entwickelnden Multiorganversagen ein [121].

Im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks, der als Hypoperfusion bzw. Ischämie des gesamten Organismus angesehen werden kann, kommt es durch die Therapie mit Volumen zu einer sekundären Schädigung, die Reperfusionsschaden genannt wird. Dabei entstehen freie Radikale, die Zellmembranen, -organellen und die DNS oxidativ schädigen. Der oxidative Stress und die Entstehung von DNS-Schäden unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen führen zu einer Aktivierung eines in allen eukaryotischen Zellen vorkommenden Wächter- bzw. Reparaturenzyms, der sog. Poly(ADP)-Ribose-Polymerase (PARP). In energieverbrauchenden Schritten werden die DNS-Schäden repariert und somit das Überleben der Zelle garantiert. Kommt es jedoch zu einer exzessiven DNS-Schädigung im Rahmen eines massiven Reperfusionsschadens, kommt es zu frustrierten Reparaturversuchen durch die PARP und damit zu einer Energiedepletion der Zelle, die daraufhin abstirbt [36, 51, 149].

Des weiteren ist PARP an der Transkription proinflammatorischer Gene bzw. an der Expression inflammatorischer Zytokine beteiligt, so dass es nach exzessiver Stimulation zu einer Verschlechterung der Mikrozirkulation und damit zu einer weiteren Einschränkung der Organperfusion kommt [71, 94, 129, 169].

Somit erscheint es sinnvoll, eine überschießende PARP-Aktivierung zu verhindern, die Zellen vor einer Energiedepletion zu schützen und dadurch ein zelluläres Überleben, wenn auch mit geschädigter DNS, zu sichern. Die protektiven Effekte von INO-1001, einem neuen hochpotenten und wasserlöslichen PARP-Inhibitor auf die Leber nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion sollen mit der vorliegenden Arbeit untersucht und diskutiert werden.

1.2 Hämorrhagischer Schock

Der hämorrhagische Schock ist ein hypovolämischer Schock, der durch einen akuten Blutverlust hervorgerufen wird. Ursächlich können Trauma, Tumoren oder Operationen sein. Dies führt zu einer geringeren Sauerstoffbereitstellung für die Organe, so dass es zu metabolischen, funktionellen und strukturellen Veränderungen kommt.

Blutverlust [ml]	≤750	750–1500	1500–2000	>2000
Blutverlust [% Blutvolumen]	≤15	15–30	30–40	>40
Herzfrequenz [1/min]	<100	>100	>120	>140
Blutdruck	Normal	Normal	Vermindert	Vermindert
Atemfrequenz [1/min]	14–20	20–30	30–40	>35
ZNS/Bewusstseinszustand	Geringe Unruhe	Mittelgradige Unruhe	Hochgradige Unruhe, Desorientiertheit	Desorientiertheit, Lethargie

Abb. 1-1 Stadieneinteilung des Hämorrhagischen Schocks Committee on Trauma (2004) Advanced trauma life support (ATLS). American College of Surgeons, Chicago, 7th edition [157]

Die Hypovolämie löst einen „Circulus vitiosus“ aus: Die Verminderung des Herz-Zeit-Volumens (HZV) aktiviert das sympathiko-adrenerge System, was zu einer Verschlechterung der Fließeigenschaften des Blutes und damit zur Verringerung der Strömungsgeschwindigkeit führt. Die daraus resultierende Mikrozirkulationsstörung mit Inhomogenität der Kapillardurchblutung löst eine Gewebhypoxie und Azidose aus [112]. Dies begünstigt eine Atonie der Gefäße und eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität, die die Hypovolämie verstärken.

Als Folge des verminderten Blutvolumens kommt es zu einer Zentralisation und Umverteilung des Blutes zu Gunsten von Gehirn- und Herzdurchblutung. Dabei werden die Nieren, die Muskulatur und das Splanchnikusgebiet minderperfundierte. Der dadurch entstehende anaerobe Stoffwechsel der Organe führt wiederum zu einer Azidose. Diese wird zwar durch die respiratorische Kompensation zum Teil ausgeglichen, doch da präkapilläre Gefäße empfindlicher auf eine Azidose mit einer Vasodilatation reagieren als postkapilläre Gefäße, kommt es zu einer „Versackung“ des Blutes im Kapillarbett. Bei erhöhter Gefäßpermeabilität kommt es zum Plasmaabfluss ins Interstitium. Die Folge ist dann eine Verstärkung der Hypovolämie,

sowie das Sludge-Phänomen der Erythrozyten und Bildung von Mikrothromben, was bis hin zur Verbrauchskoagulopathie führen kann.

Die Mikrozirkulationsstörungen der klassischen Schockorgane können mittels Intravitalmikroskopie direkt dargestellt werden [129, 165-167]. Auch in indirekten Untersuchungsverfahren z. B. der Indozyaningrün-Clearance als Indikator der Leberfunktion oder der Gewebeoberflächenoxygenierung mittels Sauerstoff-Mehrdrahtoberflächen-Elektrode lassen sich die Auswirkungen des hämorrhagischen Schocks in Form von Perfusionsausfällen und reduzierter Gewebeer-oxygenierung darstellen [100, 137, 158, 165, 168].

In einer Untersuchung von Wang et al. [168] wurde durch die Messung der Indozyaningrün-Clearance eine Korrelation zwischen Ketonkörper-Ratio und sinusoidaler Perfusion dargestellt [167], da eine direkte Abhängigkeit zwischen hepatischem Energiestoffwechsel und der nutritiven Perfusion existiert. Es ergab sich eine Leberfunktionsreduktion um 50 % im Schock. Daneben zeigte sie durch eine gleichzeitige arterielle Leberdurchblutungsmessung, dass sich Durchblutung und Funktion der Leber in einem Zusammenhang befinden [85]. Des weiteren ist bekannt, dass die Funktion der Leber von der Durchblutung abhängig ist und sich bei Minderperfusion in einem reduzierten Gallefluss zeigt [167].

Klinisch ist die Schockphase durch eine Tachykardie, in späteren Phasen des Schockgeschehens – insbesondere kurz vor kardiozirkulatorischer Dekompensation – auch Bradykardie, Erniedrigung des arteriellen pH und des Hämatokrits beschrieben [167].

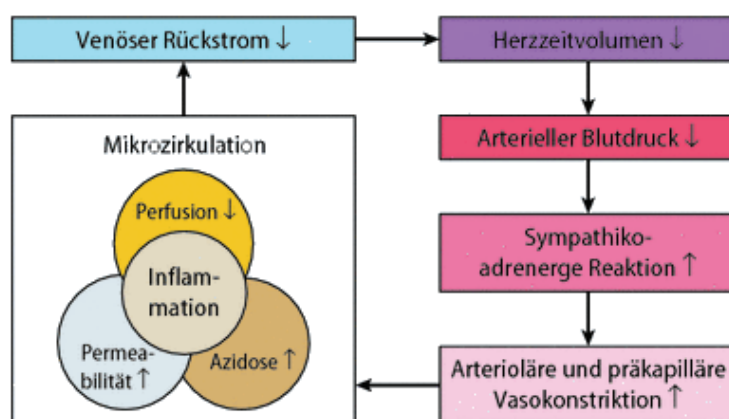


Abb. 1-2 Circulus vitiosus des hypovolämischen, hämorrhagischen Schocks [152]

1.3 Reperfusionsschaden

Die Reperfusion von ischämischem Gewebe kann orientierend in drei Phasen eingeteilt werden, wobei zeitliche Überlappungen zu beobachten sind.

In der Initialphase entstehen freie Radikale, die Zellmembranen und -organellen und die DNS oxidativ schädigen.

Bei der darauf folgenden Phase kommt es zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren (wie z. B. Zytokinen), Expression von Adhäsionsmolekülen und Aktivierung von Leukozyten, die am Endothel adhäreren und später ins geschädigte Gewebe transmigrieren.

Die dritte Phase beinhaltet das Fortschreiten und Verselbständigung der Reaktionen der ersten beiden Phasen (sog. „progression of disease“ mit Fernwirkung) [5].

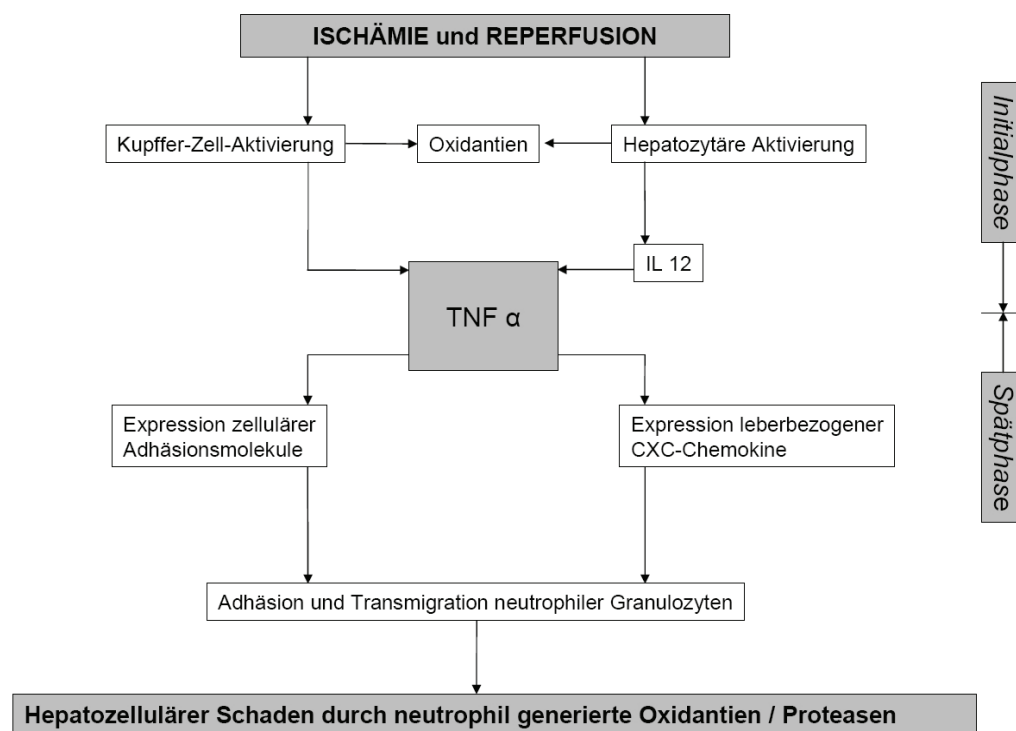


Abb. 1-3 Inflammatorische Wege des hepatozellulären HS/R-Schadens [93]

Bei der Reperfusion werden vor allem die Sinusendothelzellen geschädigt. Bei ihnen kommt es zu Veränderung des Zytoplasmas, des Zytoskelett und der extrazellulären Matrix, wodurch die Sinusendothelzellen in das sinusoidale Lumen prolabieren und sich von der Gefäßwand abspalten [26, 27, 110]. Da dadurch das Gefüge des Endothels geschädigt ist, können u. a. Leukozyten und Blutplättchen adhäreren und

zu einer Mikrozirkulationsstörung führen [31, 101, 150]. Bei diesem Prozess kann es auch zu Induktion der Apoptose der Sinusendothelzellen kommen. [46, 144].

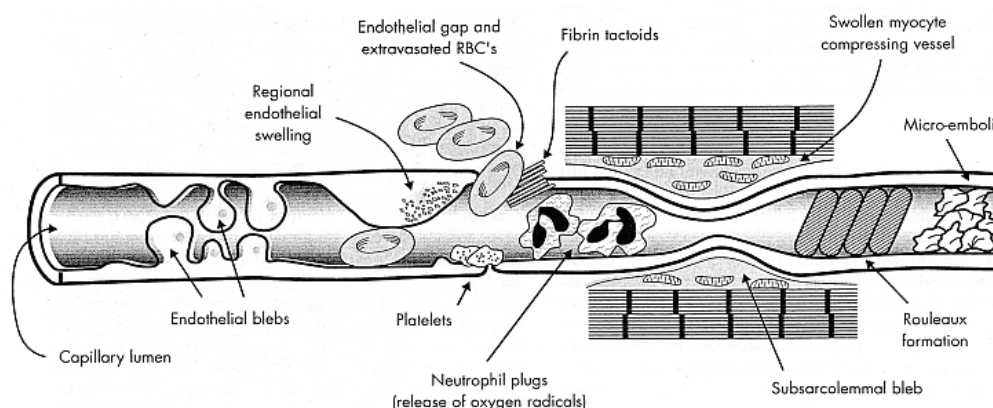


Abb. 1-4 Pathophysiologie der Mikrozirkulationsstörung
aus <http://www.benbest.com/cryonics/ischemia.html> vom 01.11.2006

Im Gegensatz zu den Endothelzellen scheinen die Parenchymzellen besser gegen den Reperfusionsschaden geschützt zu sein [27, 102]. D. h. die eigentliche Schädigung erfolgt eher sekundär durch die Sauerstoffmangelversorgung, den gebildeten Entzündungsmediatoren und den infiltrierenden Leukozyten.

Wie schon erwähnt, ist ein wichtiger Pathomechanismus beim Reperfusionsschaden die Bildung von freien Sauerstoffradikalen [72-74]. Diese können mit den meisten biochemischen Komponenten der Zelle reagieren, wobei es am häufigsten zu einer Reaktion mit der Lipidkomponente der Zellmembran kommt. Dies führt zur Schädigung mit Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran, was zur Lyse der Zelle führen kann [25].

Ein Ort für die Entstehung von toxischen Sauerstoffradikalen gleich nach der Reperfusion sind die aktivierten Kupfferzellen. Die Radikale stimulieren die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 [21]. Neben den Kupfferzellen entstehen Radikale im Zytochrom-P450-Metabolismus sowie beim Abbau von Hypoxanthin zu Xanthin im Purinstoffwechsel [122, 178]. Dies passiert unter normalen aeroben Bedingungen durch die Xanthindehydrogenase, die Produkte werden weiter verstoffwechselt, wobei NAD^+ als Elektronenakzeptor fungiert. Unter hypoxischen und hyperkalzämischen Bedingungen kommt es intrazellulär zum irreversiblen Umbau der Xanthindehydrogenase zur Xanthinoxidase.

Diese verwendet in der anschließenden Reperfusion Sauerstoff als Elektronenakzeptor, wodurch Superoxidionen entstehen [107, 108].

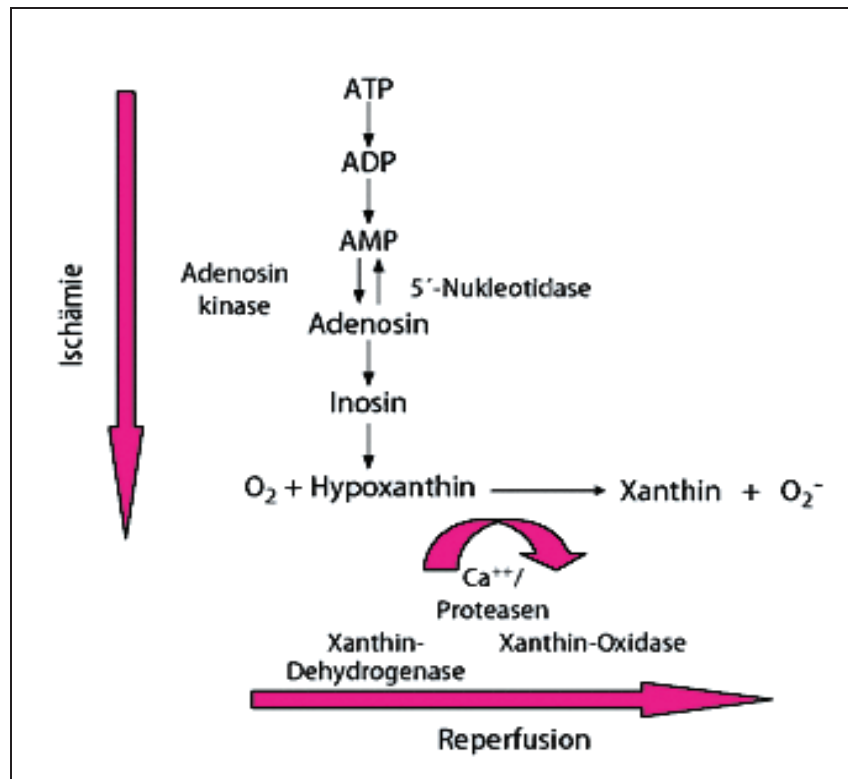


Abb. 1-5 Initialmechanismus des Ischämie-Reperfusionsschadens [152]

Erst mehrere Stunden später nach Reperfusion setzten auch die Leukozyten und die Endothelzellen toxische Radikale frei [42], wodurch es wiederum neben Zellmembranschädigung zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Zytokine oder Eikosanoide kommt.

Der Anstieg der Mediatoren führt wiederum zu einer vermehrten Bildung von freien Radikalen, was zu einem Circulus vitiosus führt.

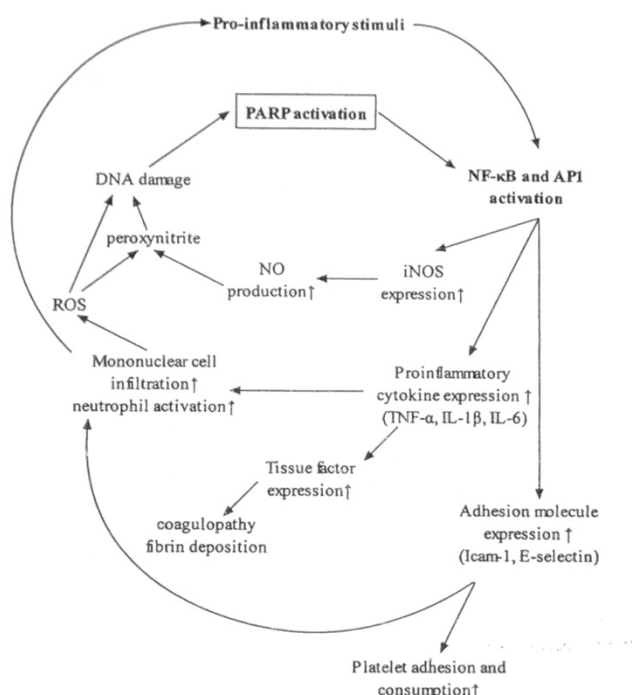


Abb. 1-6 Circulus vitiosus der Radikalentstehung und PARP-Aktivierung von Gerö und Szabó [51]

Nachgewiesen wurde die Entstehung der freien Radikale beim Reperfusionsschaden bisher durch Xanthin- und Hypoxanthin-Akkumulation [18], aber auch durch Elektronenspinresonanz-spektroskopische Untersuchung von Ausspüllösungen vor Reperfusion von transplantierten Organen und Blutproben nach Reperfusion [6, 7, 87].

Neben den freigesetzten Mediatoren spielt ebenfalls die Störung der intrazellulären Kalziumhomöostase eine Rolle. In der Ischämie-Phase wird das anfallende Proton des Laktats mit dem Na^+/H^+ -Austausch aus der Zelle transportiert. Im Gegenzug steigt der Na^+ -Spiegel, welches unter physiologischen Bedingungen mit der Na/K -ATPase reguliert wird. Aufgrund des fehlenden ATP kommt der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch zum Einsatz, woraus ein intrazellulärer Anstieg des Ca^{2+} resultiert. Bei irreversibler zellulärer Schädigung während der Reperfusion gelangt Kalzium in die Mitochondrien. Entsprechend des Energiestatus der Zelle kann ein sog. „Mitochondrial Permeability Transition Pore“ geschlossen oder geöffnet werden [56]. Bleibt dieser Kanal aufgrund von ATP-Mangel offen, so wird die Zelle eher

nekrotisch, bleibt er geschlossen, geht sie eher auf apoptotischem Weg unter [82]. Der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegelanstieg fördert weiterhin die Zunahme der Adhäsionsmolekülaktivierung, was zu einer vermehrten Leukozytenadhäsion führt [92].

Neben den aufgeführten Wegen für die Entstehung von Entzündungsmediatoren und Radikalen spielt das Stickstoffmonoxid (NO) eine Rolle beim hämorrhagischen Schock, wobei noch nicht alle Pathomechanismen vollständig untersucht sind [60]. NO wird zum einen konstitutiv durch die endotheliale-Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), zum anderen über eine induzierbare Synthase (iNOS) gebildet. Daneben kann das Stickstoffmonoxid auch aus Nitrit bei niedrigem PH-Wert entstehen. Das Stickstoffmonoxid aus den beiden Synthasen wirkt auf unterschiedlichen Wegen [29]. Das NO aus dem eNOS hilft bei Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation [60]. Daneben wird die iNOS durch Entzündungsmediatoren vermehrt expremiert, wodurch das gebildete NO mit Superoxid-Ionen zu Peroxynitrit reagiert. Sowohl Superoxidionen als auch Peroxynitrit sind in der Lage DNS-Einzelstrangbrüche zu erzeugen, was wiederum eine PARP-Aktivierung zu Folge hat [51].

Zwischen der Bildungsrate freier Radikale in der Leber und der Ischämiezeit, sowie von der Dauer der Reperfusion [92], besteht ein direkter Zusammenhang.

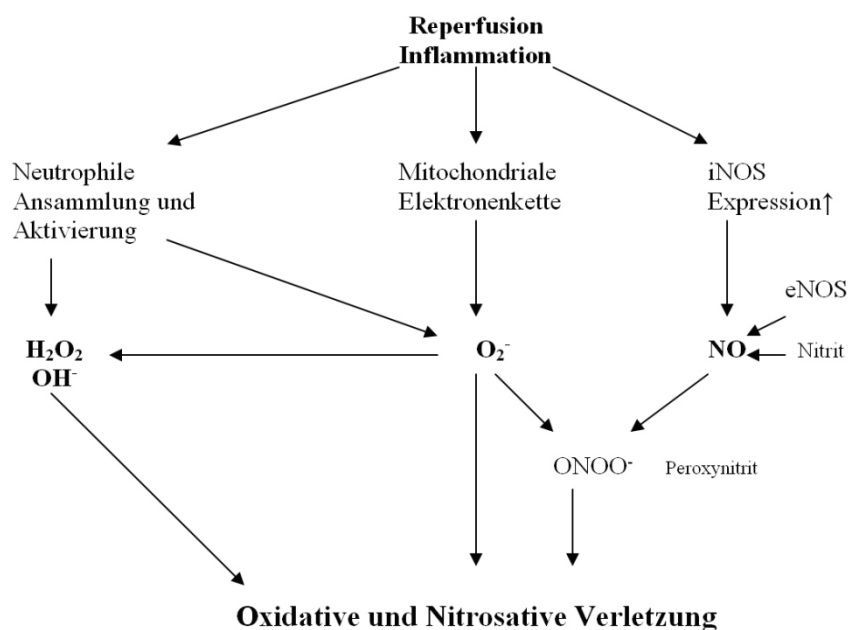


Abb. 1-7 Bildung von NO, Superoxid und Peroxynitrit von Gerö und Szabó [51]

1.3.1 Folgen des hämorrhagischen Schocks für die Leber

Die Leber ist für vielfältige Aufgaben, wie Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase, Proteinsynthese und Elimination von Bakterien und Toxinen, zuständig. Beim hämorrhagischen Schock wird die Perfusion der Leber aufgrund der Sympathikusaktivierung umverteilt und es kommt zu einer sinusoidalen Perfusionsabnahme durch Verkleinerung des Lebersinusoiddurchmessers [85] sowie einer Aktivierung von Leukozyten in der Mikrostrombahn [167]. Andere Faktoren, die die Perfusion beeinflussen, sind Passagestörungen von Leukozyten durch Sinusoide, Zellschwellung und interstitielle Ödeme [34, 84]. Die Fließgeschwindigkeit des Blutes ist erniedrigt und es kommt zu einer Interaktion von Leukozyten mit dem sinusoidalen Endothel und einer Adhärenz in den postsinusoidalen Venolen, was durch Bildung von Adhäsionsmolekülen auf der Leukozyten- und Endotheloberfläche hervorgerufen wird, welches besonders bei Reperfusion auftritt [61, 161, 162]. Im Sinne einer Entzündungsreaktion werden die Transkriptionsfaktoren wie dem nuclear factor kappaB (NF-κB) und activator protein 1 (AP1) hochreguliert. In der Folge werden inflammatorische Zytokine, wie tumor necrosis factor-α (TNF-α), Interleukin-1β (IL-1β) und Interleukin-6 (IL-6) expremiert. Des weiteren wird auch die Produktion von Adhäsionsmolekülen, wie dem intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) oder Selectinin hochreguliert [51].

Die makro- und mikrozirkulatorischen Störungen der Leberdurchblutung führen zu einer verminderten Bereitstellung von Energie in Form von ATP [15, 114, 129, 167]. Experimentelle Untersuchungen konnten eine direkte Abhängigkeit zwischen der nutritiven Perfusion und dem hepatischen Energiehaushalt nachweisen. [167].

Es besteht eine direkte Anhängigkeit zwischen der Schädigung der Sinusendothelzellen, den Veränderungen der Mikrozirkulation und dem damit verbundenen Energiemangel und der Galleproduktion als exokrinen Leberfunktionsparameter [11, 30, 47, 150].

1.4 Mikroskopische Anatomie der Leber

Das Lebergewebe wird durch morphologische und funktionelle Einheiten mikroskopisch gegliedert.

Dies sind die periportaln Felder oder auch „Glisson’sche Trias“ deren Gesamtheit das klassische Venenläppchen, Lobulus hepatis, bilden.

Da beim Menschen das Stroma nicht so stark ausgebildet ist wie bei den meisten Tieren, sind die Läppchengrenzen an der menschlichen Leber schwieriger abzugrenzen.

Der mikroskopische Aufbau ist in Abbildung 1-8 und die Strukturen eines Lebersinusoid in 1-9 dargestellt. Daneben existieren Unterteilungen der mikroskopischen Gliederungen in Abschnitte mit unterschiedlichen Sauerstoff-, Nährstoff- und Stoffwechselproduktgehalt, die von Rapport et al. [126] beschrieben wurden.

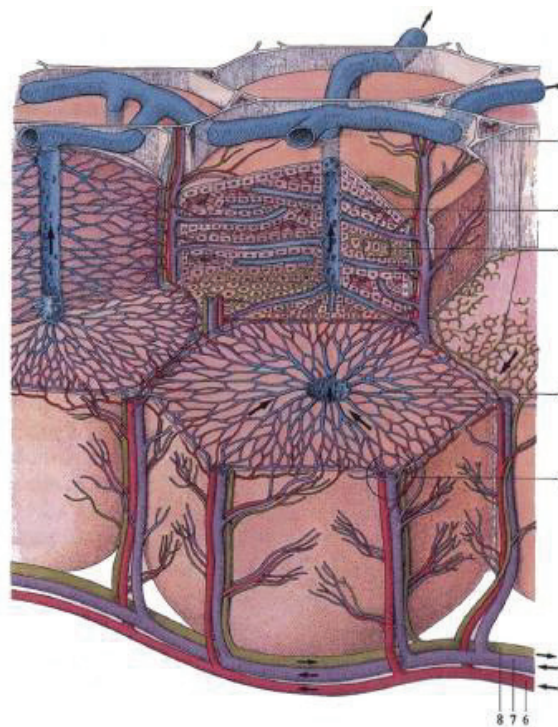


Abb. 1-8 Mikroskopischer Aufbau der Leber

1 Glissonsche Trias, 2 Lebersinusoid mit Leberzellplatten, 3 System der interzellulären Canaliculi biliferi, 4 Vena centralis, 5 Glisson-Trias aus je einem Ast der A. interlobularis, V. interlobularis und Ductus interlobularis bilifer, 6 Ast der A. hepatica, 7 Ast der V. portae, 8 Ast des Ductus bilifer, aus: <http://www.hepatitis-c.de/leber2.htm> vom 14.03.2007

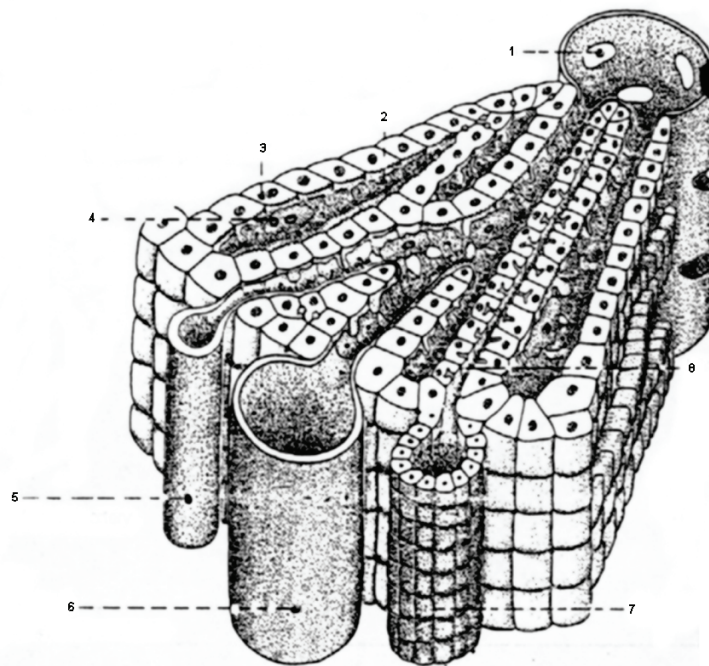


Abb. 1-9 Lebersinusoid

1 Intralobuläre Vene aus der V. hepatica, **2** Sinusoid, **3** Hepatozyt, **4** Kupfferzelle, **5** Arteriole aus A. hepatica, **6** Interlobuläre Vene aus V. portae, **7** Gallengang, **8** Gallenkanälchen, aus <http://www.tracy.k12.ca.us/thysadvbio/favorite.html> vom 14.03.2007

1.5 Gefäßversorgung der Leber

Die Leber wird durch Leberarterie und der Portalvene mit Blut versorgt, wobei die Arterie ca. 25 % und die Vene 75 % Anteil an der Versorgung hat. Da die Portalvene das zum Teil desoxygenierte Blut vom Darm, Milz und Pankreas führt, macht die Sauerstoffversorgung nur 50 - 60 % aus, der Rest kommt von der Arterie hepatica. Der Abfluss erfolgt über die untere Hohlvene.

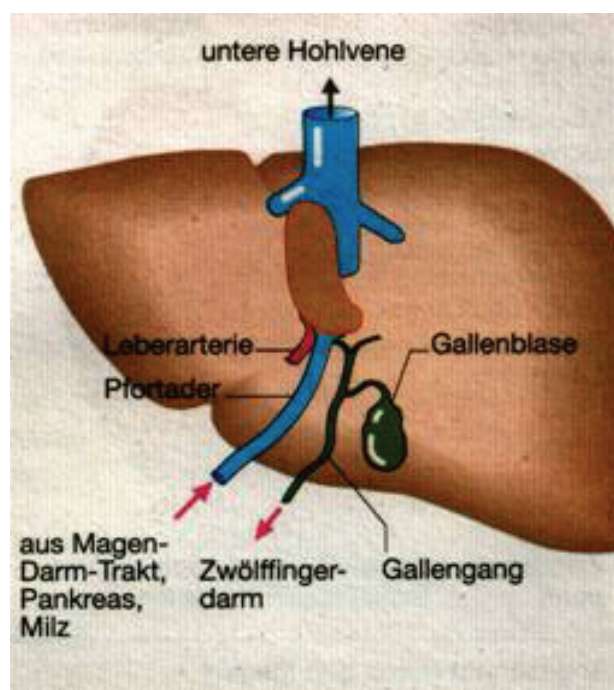


Abb. 1-10 Blutversorgung der Leber
aus http://www2.uni-jena.de/erzwiss/projekte_2004/martin_laudenbach_kohl/Leber_Galle.html vom
14.03.2007

Die Autoregulation des Blutflusses für die Leber wird durch die Arterie geregelt, da die Vena portae ein Niederdrucksystem ist und lediglich einen niedrigen Gefäßwiderstand besitzt, trägt sie nicht bzw. nur sehr gering dazu bei. Nach Untersuchungen von Lauth et al. [90] besteht ein intrinsisches Autoregulationssystem für den arteriellen Zufluss, der über Adenosin vermittelt wird. Aber es spielen auch extrinsische Faktoren eine Rolle, sie beinhalten die sympathische vasokonstriktorische Kontrolle über die Nn. splanchnici, humorale Einflüsse von Serotonin und Kinine und die systemische hämodynamische Komponente. Dieses System wird „Hepatic arterial buffer response“ genannt und reguliert die Blutzufuhr der Arterie, um Veränderungen in der Durchblutung der Portalvene auszugleichen [60, 90, 127].

Neben diesen Regulationsmechanismen existiert noch eine Steuerung der Mikrozirkulation der Leber durch Kontraktion und Relaxation der Ito-Zellen, wodurch es zu Erweiterung oder Verengung der Sinusoide kommt [63, 119, 130].

1.6 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase

PARP ist ein in allen eukaryotischen Zellen vorkommendes Enzym und wird als sog. Wächter- bzw. Schutzenzym angesehen. Kommt es unter physiologischen oder pathologischen Umständen zu einer DNS-Schädigung wird PARP aktiviert und repariert mit Hilfe der Enzyme des „base-excision and repair Komplexes“ (Endonukleasen, Polymearasen, Glykosylasen, Ligasen u. a.) die geschädigte DNS. D. h. PARP ist ein sinnvolles und nützliches Enzym, das das zelluläre Überleben sichert bzw. eine maligne Entartung oder Mutation reduziert.

Beim hämorrhagischem Schock bzw. schweren Ischämie/Reperfusionsgeschehen wird der Aktivierung des PARP-1-Enzyms eine große Bedeutung beigemessen. Szabó und Virág haben die Funktionsweise nach dem Schweregrad der DNS-Schädigung in drei Ablaufmöglichkeiten eingeteilt [164] (siehe Abbildung 1.11). Der erste Weg läuft bei geringer Schädigung ab und leitet die Pausierung des Zellzykluses sowie die Interaktion mit DNS-Reperaturenzymen, XRCC1 (X-ray repair complementing) und DNS-abhängige Proteinkinase (DNS-PK) ein. So kann die genetische Information repariert werden ohne dass mutierte Genprodukte entstehen. Hierfür bildet PARP-1 Ketten von Poly(ADP-Ribose) durch Spaltung von NAD^+ , welches für die weiteren Reparaturschritte der DNS von Nöten ist [143].

Ein zweiter Weg, der bei stärkerer Schädigung der DNS stattfindet, wo eine Reparatur nicht mehr möglich ist, liegt bei der Spaltung von PARP-1 in zwei Fragmente (24 und 89 kDa) wodurch die Apoptose eingeleitet wird. Die Spaltung erfolgt durch Caspase-Enzyme, welche die Hauptenzyme bei apoptotischen Prozessen darstellen. Dies verhindert die Bildung von Poly(ADP-Ribose)-Einheiten [143], wodurch Energie eingespart wird, die zu einem kontrolliertem Zelltod – der Apoptose notwendig ist. Der Nachweis der PARP-Fragmente (24 und 89 kDa) gilt daher als Apoptosenachweis [146].

Ist die Schädigung der DNA so stark, dass sie irreperabel ist, erfolgt der dritte Weg: Es kommt zu einer übermäßigen Aktivierung vom PARP-1, was zu einer Energiedepletion (NAD^+ , ATP) führt [51, 164]. Als Folge kann die Zelle nicht mehr den apoptotischen Weg einschlagen, wird daher nekrotisch untergehen [164] und in einer Entzündungsreaktion abgeräumt werden.

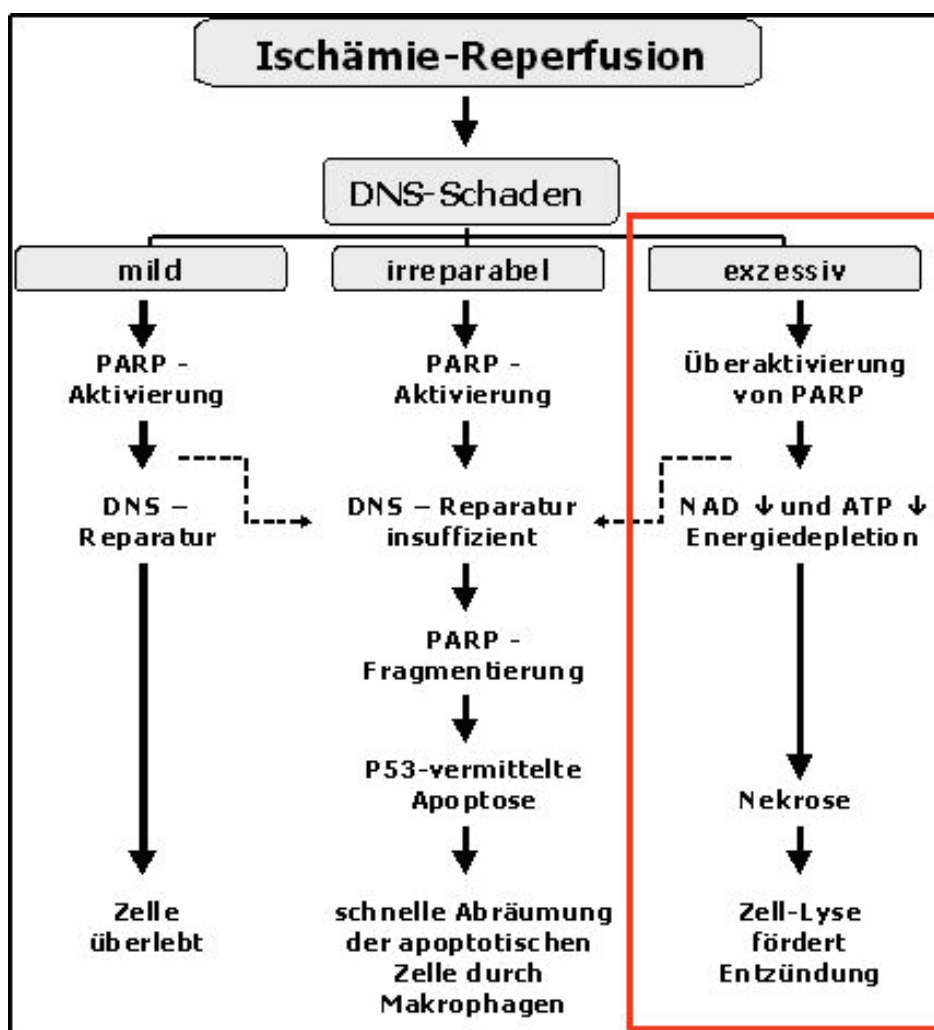


Abb. 1-11 PARP Aktivierungswege

PARP-Aktivierung und deren Folge in Abhängigkeit vom Schweregrad der DNS-Schädigung (modifiziert nach Pacher P, Szabo C Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors [118])

Bis heute sind sechs Enzyme bekannt, die zu der PARP-Gruppe gehören. PARP-1 erkennt durch zwei Zink-Finger-Strukturen Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNS [24, 69, 106] und bindet mittels einem Strukturkomplex BER (base excision repair complex) am Strangbruch. Lokalisiert ist das Enzym an perizentromerischen und zentromerischen Abschnitten des Chromosoms [132]. PARP-2 wird ähnlich wie PARP-1 durch DNS-Strangbrüche aktiviert und ist involviert bei Basenexzision während Reparaturmechanismen am genetischen Material [135]. Anders als PARP-1 findet man PARP-2 direkt am Zentromer [132].

Beide Enzyme sind ein wichtiger Bestandteil an der genetischen Stabilität der Gene in der Embryonalentwicklung [111].

Das dritte Enzym aus dieser Reihe ist als Kernbestandteil im Zentrosom, welches den Zellzyklus an der G1/S-Phase negativ beeinflusst, bekannt [9]. Es synthetisiert Poly(ADP-Ribose) in vitro und formt einen stabilen Komplex mit PARP-1.

PARP-4 wird auch als Vault PARP (VPARP) bezeichnet und gehört zum zytoplasmatischen Ribonukleoproteinkomplex. Die Funktion ist bis jetzt noch unklar, jedoch wird angenommen, dass es eine Rolle bei intrazellulären Kern-Zytoplasma-Transporten und damit bei der intrazellulären Entgiftung spielt [160].

Die letzten beiden Enzyme der Gruppe, PARP-5a und -b werden auch Tankyrase-1 und -2 genannt, da sie zuerst in der Interaktion mit den „telomeric-repeat binding factor 1“ entdeckt wurden, bei der sie die Telomerenlänge negativ regulieren [36, 145]. Dies beeinflusst die Lebensspanne der Zelle, denn nach Verlust der Telomere ist die Zelle nicht mehr fähig sich zu teilen und geht in den kontrollierten Zelltod über.

Beide Enzyme hängen stark miteinander zusammen und interagieren mit einer Vielzahl von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen, so dass eine große Überschneidung ihrer Funktion besteht [36].

Weiterhin wird die Aktivierung von PARP-1 für die Translokation von dem apoptosis-inducing factor (AIF) vom Mitochondrium zum Zellkern benötigt, welches für den PARP-1 abhängigen Zelltod mitverantwortlich ist [177].

Neben der DNS-Reparatur nimmt PARP eine Schlüsselposition in der Regulation der Transkription pro-inflammatorischer Gene und der Expression inflammatorischer Zytokine ein. PARP ist beispielsweise ein Co-Aktivator von nuclear-factor-kappa-B(NF-κB)-abhängigen Transkriptionsprozessen [58, 117].

1.6.1 PARP-Inhibitoren

Die wichtige zelluläre Bedeutung der PARP konnten unter Verwendung von „knockout“ Mäusen beobachtet werden. Es zeigt sich eine erhöhte Instabilität der genetischen Information und verstärktes Ansprechen auf Mutagene, wodurch die Lebensspanne verkürzt und die Rate an spontanen Tumoren erhöht ist [123].

PARP-Inhibitoren kann man in eine alte und neue Generation einteilen. Gemein ist beiden Substanzgruppen, dass sie eine kompetitive Hemmung durch Bindung an der NAD^+ katalytischen Domäne hervorrufen.

Die erste Generation waren Abkömmlinge von Nikotinamid, beispielsweise 3-Aminobenzamid, mit denen die Wirkung von DNS-schädigenden Substanzen verringert werden konnte [138, 170]. Sie hatten jedoch nur eine geringe Wirkstärke, niedrige Löslichkeit und schlechte Spezifität [51]. Die nächsten PARP-Inhibitoren, wie Benzimidazol-Carboxamide oder das 1,5-Dihydroxyisoquinolinon (1,5-DIQ) waren nicht wasserlöslich und wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. DMSO hat Radikalfängereigenschaften, vermittelt in höherer Dosierung jedoch toxische Effekte [175]. Erst die neueste Generation von PARP-Inhibitoren, zu denen auch 5-Aminoisoquinolinon (5-AIQ, Isoquinolinon-Derivat), PJ-34 (Phenanthridion-Derivat) und INO-1001 (Isoindolinon-Derivat) gehören, sind sowohl sehr gut wasserlöslich als auch spezifisch für PARP. INO-1001 wird bereits in Phase-II-Studien bei Reperfusionszuständen und in der Krebstherapie eingesetzt [23, 118].

1.7 Zielstellung

Beim hämorrhagischen Schock kommt es durch die Ischämie- und der anschließenden Reperusionsphase zur Bildung von reaktiven Metaboliten, die eine exzessive und größtenteils irreversible Schädigung der DNS verursachen. Die daraus folgende Aktivierung von den PARP-Enzymen hat einen Verbrauch an zellulärer Energie in Form von ATP und NAD^+ zur Folge und es kommt zum Untergang der Zelle [134]. Eine Hemmung der PARP-Aktivierung könnte eine therapeutische Option darstellen, indem die geschädigten Zellen „mittelfristig überleben“ und noch Energie bereitstellen könnten, die für z. B. Stoffwechselprozesse notwendig sind. In der vorliegenden Arbeit wurde der therapeutische Einsatz eines potenten wasserlöslichen PARP-Inhibitors (INO-1001) bei hämorrhagischem Schock vor Reperfusion und dessen Auswirkungen auf die Leber untersucht.

Die Untersuchungen wurden im Großtiermodell an akut instrumentierten deutschen Hausschweinen durchgeführt und dienten zur Beantwortung der folgenden Fragen:

1. Welchen Effekt hat die systemische Gabe von INO-1001 beim hämorrhagischen Schock vor Reperfusion auf die Durchblutung der Leber?
2. Welchen Effekt hat die Gabe von INO-1001 beim hämorrhagischen Schock vor Reperfusion auf die Gewebeoberflächenoxygenierung der Leber als Ausdruck der eingeschränkten Organoxygenierung?
3. Welchen Effekt hat die systemische Gabe von INO-1001 beim hämorrhagischen Schock vor Reperfusion auf die hepatozelluläre Schädigung gemessen an der Freisetzung von Alanin-Aspartat-Transferase (ASAT)?

2 Material und Methodik

2.1 Versuchsgenehmigung

Nach Genehmigung der Tierversuche durch das Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg-Vorpommern (LVL M-V/TSD/7221.3-1.2-041/04) wurden die Versuche in den Räumlichkeiten des Instituts für experimentelle Chirurgie (IEC) der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock (Direktorin Prof. B. Vollmar) durchgeführt.

2.2 Tiere

Die 14 männlichen Versuchstiere gehörten der Gattung „Deutsches Hausschwein“ an, die ein Gewicht zwischen 27 und 31 Kilogramm besaßen.

Sie wurden eine Woche vor Versuchsbeginn von der Sauenaufzuchtanlage Parkentin (Inh. Wübbel) an den Bereich Großtierhaltung des IEC geliefert. Dort konnten sie sich akklimatisieren, so dass optimale Ausgangsbedingungen für die Versuche gegeben waren.

Die Tiere wurden mit einer Standardnahrung gefüttert. 24 h vor Versuchsbeginn erhielten sie keine Nahrung, hatten jedoch freien Zugang zu Wasser.

2.3 Anästhesie

2.3.1 Prämedikation und Narkose

Am Morgen des Untersuchungstages wurden die Tiere mit 0,3mg/kg Midazolam i.m. (Dormicum®; Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und 10 mg/kg i.m. Ketamin (Ketanest®; Parke-Davis, Freiburg, Deutschland), sediert und in den Großtier-OP transportiert.

Nach Legen einer Venenverweilkanüle in eine Ohrvene wurde nach 5 Minuten Vorbeatmung mit 100 % Sauerstoff die Narkose mit 3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Fentanyl (Fentanyl-Janssen®; Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland), 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Ketamine und 0,25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Flunitrazepam (Rohypnol®, Hoffmann-La Roche AG, Deutschland) eingeleitet. Die Tiere wurden nach Injektion von 0,3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Pancuronium (Pancuronium, DeltaSelect, Dreieich, Deutschland) orotracheal intubiert (ID 7,5) und druckkontrolliert beatmet. Die Anästhesie wurde mittels kontinuierlicher Infusion von Flunitrazepam (0,1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), Ketamin (8,0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) und Pancuronium

($0,15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) aufrechterhalten. Eine Basisinfusion wurde mit $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ infundiert. Nach der Präparation erfolgte die Narkose- und die Volumengabe über einen Schenkel eines dreilumigen zentralvenösen Katheters in der Vena jugularis interna.

2.3.2 Beatmung

Die Beatmung erfolgte druckkontrolliert mit einem Ventilator Typ Servo 300 (Siemens, Erlangen, Deutschland). Die inspiratorische Sauerstoffkonzentration lag bei 21 %. Die Steuerung von Atemfrequenz und Atemzugvolumen erfolgte nach Blutgasanalyse (ABL 615–Autoanalyzer, Radiometer Copenhagen, Kopenhagen, Dänemark). Dabei wurde der arterielle Kohlendioxidpartialdruck ($p_a\text{CO}_2$) zwischen 4,5 – 5,6 kPa (35–42 kPa) und der arterielle Sauerstoffpartialdruck ($p_a\text{O}_2$) zwischen 12,6 – 15,3 kPa (95 – 115 kPa) gehalten.

2.3.3 Volumenmanagement

Allen Tieren wurde eine auf 37° C angewärmte kristalloide Lösungen (Jonosteril[®], Fresenius-Klinik, Bad Homburg, Deutschland) infundiert. Die Infusionsrate lag bei $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Der Volumenstatus wurde mittels PiCCO-Messungen (ITBV) ermittelt.

2.3.4 Extraabdominale Gefäße

Nach Hautdesinfektion mit Polyvidonjod wurde durch eine ca. 10 cm lange Hautinzision an der rechten ventrolateralen Seite des Halses die Vena jugularis durch stumpfe Präparation dargestellt. Das craniale und caudale Ende des Gefäßes wurde locker mit einer Ligatur umschlungen. Mittels Seldinger-Technik konnte eine 8.5 Fr-Schleuse (Arrow, Percutaneous Sheath Introducer Set, Arrow, Reading, PA, USA) 6 cm nach caudal und ein 3-lumiger zentralvenöser Katheter (Arrow, Reading, PA, USA) in das Gefäß eingebracht.

Mit den beiden vorher gelegten Ligaturen wurden die Schleuse und der Katheter am Gefäß fixiert und weiterhin an der Haut befestigt. Anschließend erfolgte der Verschluss der Wunde durch eine Hautnaht.



Abb. 2-1 Halspräparation

Die nach caudal gerichtete Schleuse diente zum Einschwemmen eines Pulmonalarterien-Katheters (Arrow, Reading, PA, USA), der es gestattete den systolischen, diastolischen pulmonalen arteriellen Druck, das Herz-Zeit-Volumen (HZV), die Körpertemperatur (im Blut) und den pulmonalen Verschlussdruck zu messen.

Der zentrale Schenkel des 3-lumigen Katheters diente zur Bestimmung des zentral venösen Druckes. Über die anderen beiden Schenkel wurde die Narkose- und Infusionlösung infundiert.

Die Arteria femoralis dextra und sinistra wurden nach Hautdesinfektion mit Polyvidonjod jeweils über einen 5 cm langen ventralen Hautschnitt und anschließender stumpfer Präparation freigelegt und punktiert. In die rechte Arterie wurde mittels Seldingertechnik eine 5 Fr-Schleuse (Arrow, Percutaneous Sheath Introducer Set, Arrow, Reading, PA, USA) und in die linke ein einlumiger PiCCO-Katheter (5P, Pulsion Medical Service, München, Deutschland) platziert. Beide arteriellen Zugänge konnten durch Annähte an die Haut fixiert werden. Anschließend erfolgte durch eine Naht der Hautverschluss.

Über die arterielle Schleuse erfolgt zugleich das kontrollierte Ausbluten der Tiere in der Schockphase.

Der einlumige Katheter diente zur Messung der arteriellen Blutdruckwerte und für die Abnahme von arteriellen Blutproben.

2.3.5 Abdomenpräparation

Nach Hautdesinfektion mit Polyvidonjod wurde das Versuchstier laparotomiert und der Darm mit feuchten, erwärmten Bauchtüchern abgedeckt.

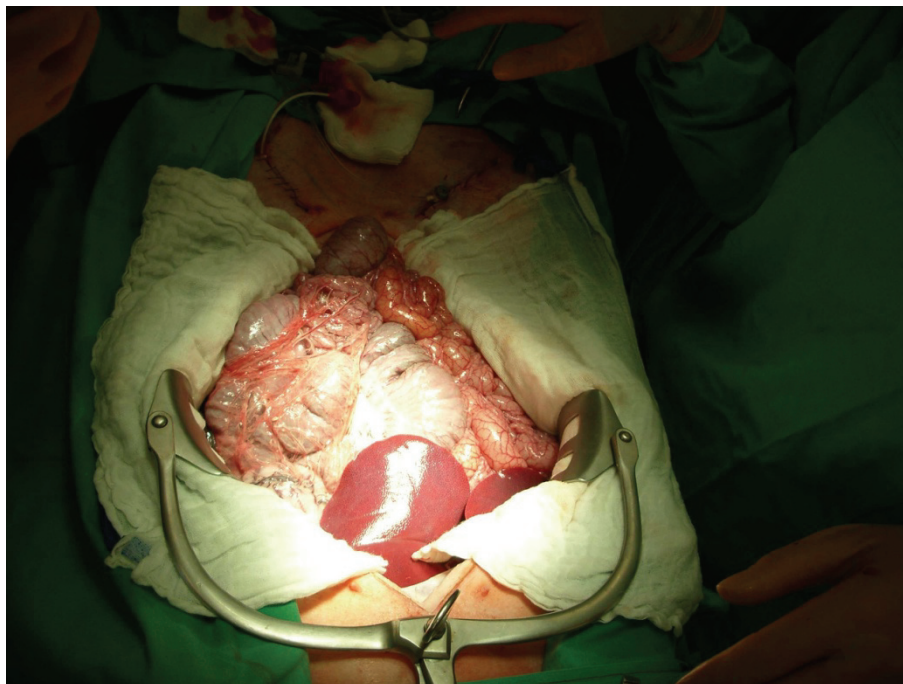


Abb. 2-2 Abdomen eröffnet

2.3.6 Arteria hepatica propria

Die Arteria hepatica wurde im Ligamentum hepatoduodenale freigelegt und von einem Ultraschallmesskopfes der Größe 4 SB umschlossen. Zur Verbesserung der Signalstärke erfolgte das Einbringen von Ultraschallgel zwischen dem Flussmesskopf und dem Gefäß.

2.3.7 Portalvene

Die Vena portae wurde bis kurz vor ihrem Eintritt in die Leberpforte freigelegt. Es folgte ebenfalls die Anlage eines Ultraschallmesskopfes (10SB) sowie das Einbringen

von Ultraschallgel. Zur Blutgewinnung wurde die Pfortader mit einem Katheter (Leadercath 20G, Vyggon Co., Ecoen. Frankreich) kanüliert.

2.3.8 Katheterisierung der Vena hepatica

Über Seldinger Technik erfolgte die transparenchymale Kanülierung der Vena hepatica sinistra mit einem Einlumenkatheter (16G Central Venous Catheterization Set, Arrow, Reading, PA, USA) nach Paschen [120]. Die Befestigung des Katheters erfolgte durch eine vorsichtige Annaht an der Leberkapsel.

Die Blase wurde offen chirurgisch mit einem großlumigen Blasenkatheter drainiert und mittels Tabaksbeutelnaht befestigt.

Am Ende der Präparation wurde das Peritoneum und die Haut mit einer Naht so verschlossen, das eine 15 cm lange Öffnung blieb, die es erlaubte, an den einzelnen Messzeitpunkten die Oberflächengewebeoxygenierung an der Leber vorzunehmen. Diese Öffnung wurde mit 3 Klemmchen verschlossen und mit feuchten Tüchern abgedeckt.

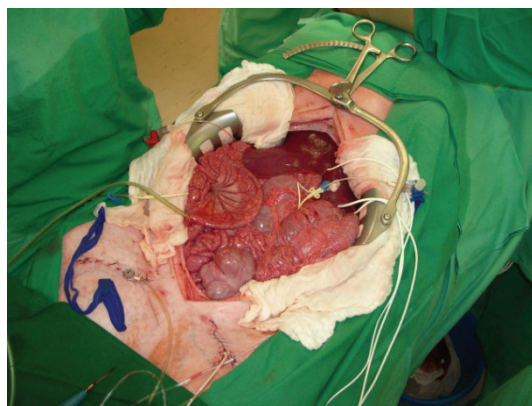


Abb. 2-3 Abdomen nach Katheteranlage

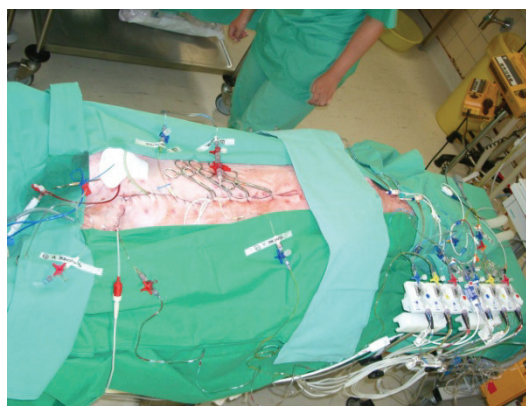


Abb. 2-4 Abdomen nach Präparation

2.4 Messmethoden

2.4.1 Herzfrequenz

Die Messung der Herzfrequenz erfolgte durch automatische Auszählung der Pulskurven der arteriellen Blutdruckmessung.

2.4.2 Herzzeitvolumen

Mittels der Thermodilutionsmethode (Fegler 1954, Ganz 1972) konnte über den Pulmonalarterienkatheter das Herzzeitvolumen gemessen werden. Dazu wurden 10 ml eiskühlter 0,9%igen NaCl-Lösung über den zentralvenösen Schenkels des ZVK in den rechten Vorhof injiziert. Durch einen hämodynamischen Monitor (Baxter CO-Monitor, Unterschleißheim, Deutschland) konnte das Herzzeitvolumen mittels der Gleichung nach Stewart und Hamilton berechnet werden, wobei der Mittelwert von drei Einzelmessungen mit einer Abweichung kleiner 10 % das endgültige Herzzeitvolumen ergab.

2.4.3 Intravasale Druckmessung

Mittels Druckaufnehmern (Medex Medical, Rogial MX 960, Haslingden, Rossendale, Lancashire, Großbritannien) mit Spülsystemen (Medex Medical, Haslingden, Rossendale, Lancashire, Großbritannien), die mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung gefüllt waren, konnte der systemische systolische und diastolische Blutdruck, der systolische und diastolische pulmonalarterielle Druck, der pulmonalkapilläre Verschlussdruck sowie der portalvenöse und hepatovenöse Druck gemessen werden.

Eine kontinuierliche Darstellung und Aufnahme mit 50 Hz erfolgte durch ein PO-NE-MAH-System (Digital Aquisition Analysis and Archive Systems, Plugsys, Simsbury, USA).

2.4.4 Blutflussmessung

Mittels perivaskulär platzierter Ultraschallflussmessköpfe (Transsonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) wurden die Flüsse der Arteria hepatica und der Vena portae mit einem Flowmeter (T 208, Transsonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) gemessen und mit dem PO-NE-MAH-Datenaufnahmesystem aufgezeichnet.

2.4.5 Blutvoluminamessung

Um das kardiovaskuläre und volumetrische Monitoring durchzuführen, konnte das PiCCO System (PiCCO plus, Firma Pulsion Medical Systems, München, Deutschland) verwendet werden. Mittels diesem wurde über eine Thermodilutionsmessung der Intrathorakale Blutvolumenindex (ITBI) bestimmt.

2.4.6 Blutgase

Die Analyse der heparinisierten Blutproben erfolgte mit einem Blutgasautomaten ABL 615 (Radiometer Copenhagen, Kopenhagen, Dänemark).

Sauerstoffangebot und -verbrauch

Die Parameter:

- Sauerstoffgehalt: arteriell, portalvenös
- Sauerstoffangebot: systemisch, hepatisch
- Sauerstoffverbrauch: hepatisch

wurden mit den oben genannten hämodynamischen Werte und den Blutgasanalysen berechnet. Die dafür verwendeten Formeln sind im Anhang zu finden.

2.4.7 Gewebesauerstoffpartialdruck

Über eine Mehrdrahtoberflächenelektrode (Sauerstoff-8-Kanalelektrode, Firma Eschweiler, Kiel, Deutschland) wurde der Oberflächensauerstoffpartialdruck der Leber nach dem Verfahren von Kessler und Lübke gemessen [79].

Eine Kalibrierung der Elektrode erfolgte vor jeder Messung bei 37° C, 20,8 % und bei 0 % Sauerstoff.

Eine spezielle Halterung auf der Leberoberfläche sorgte für eine optimale Auflagerung auf dem Organ und verringerte Messstörungen durch die Umgebungsluft.

Die Aufzeichnung und Speicherung der Daten erfolgte über ein Mikroprozessor gesteuertes System des Ingenieurbüros für Mess- und Datentechnik, Dipl.-Ing. K. Mußler in Aachen, Deutschland.

Aus ca. 200 Messwerten pro Messstelle wurde ein Mittelwert des Gewebeoberflächenpartialdrucks berechnet.

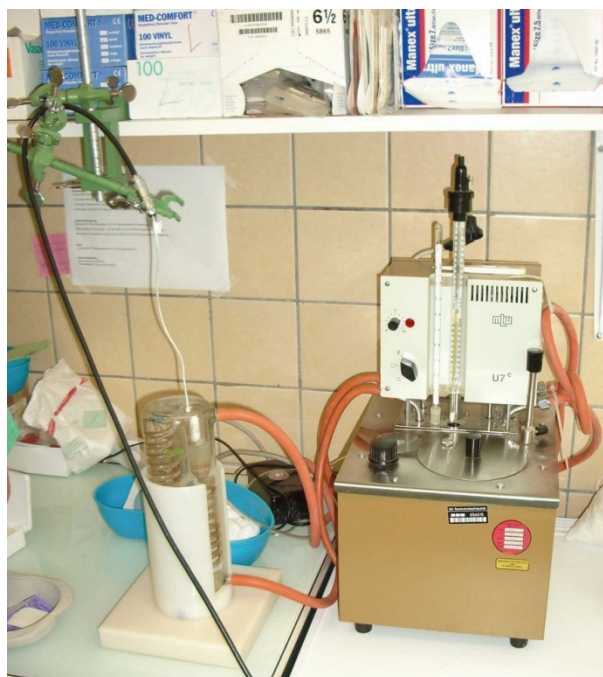


Abb. 2-5 Arbeitsplatz mit der Mehrdrahtoberflächenelektrode

2.4.8 Klinische Chemie

Zur Bestimmung des zellulären Leberschadens wurde die Aktivität der Aspartat-Aminotransferase (AST) im arteriellen Blut gemessen. Dazu erfolgte eine Zentrifugation des Blutes bei 4000 U/min für 5 Minuten und das Plasma konnte abpipetiert werden. Die Proben wurden bei -70°C tiefgefroren und gelagert und schließlich im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. med. P. Schuff-Werner) gemessen.

Über den ABL 615 Autoanalyzer (Radiometer Copenhagen, Kopenhagen, Dänemark) wurden Glukose und Laktat bestimmen.

2.4.9 Histologie

Nach dem letzten Messzeitpunkt wurde von den Lebern aller Tiere Gewebe entnommen und in Formaldehyd (4 %) fixiert.

2.4.10 PARP-Färbung

Die PARP-Aktivität wurde immunhistologisch in Gewebeschnitten nachgewiesen. Dazu fand ein Huhn-Anti-Schwein-Antikörper Verwendung (4 µg/ml, Vector Laboratories, Burlingame, California, USA). Als Zweitantikörper wurde ein biotinylierter Ziege-Anti-Huhn-Antikörper (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) verwendet.

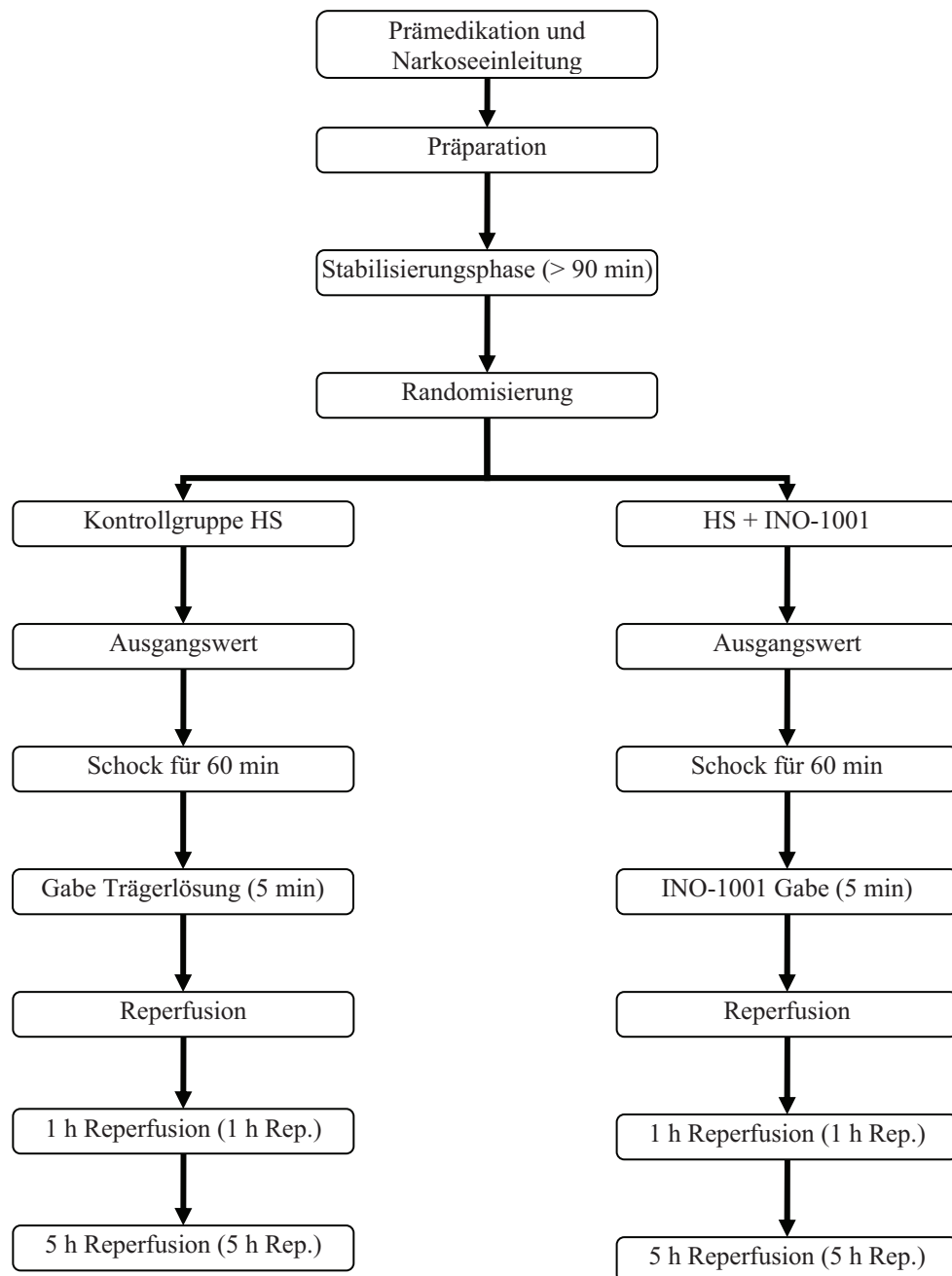
Die Gewebeschnitte konnten anschließend mit Peroxidase (VECTASTAIN Elite ABC, standard kit) unter Verwendung von Diaminobenzidin als Substrat inkubiert werden. Anschließend erfolgte eine Kernfärbung (nuclear fast red, GeneTex, Inc., Irvine, California, USA).

2.5 Studienprotokoll

Am Ende der Präparation schloss sich eine 90-minütige Stabilisierungsphase an. Nach dieser wurden die Tiere in eine der beiden Gruppen (Kontrollgruppe hämorrhagischer Schock (HS) oder hämorrhagischer Schock + INO-1001 (INO) randomisiert und die Daten für den Ausgangsstatus aufgenommen. Anschließend wurden beide Gruppen kontrolliert auf einen mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) von 40 mmHg ausgeblutet. Dieser Ziel-MAP wurde für eine Stunde durch weitere Blutentnahme bzw. durch Infusion von kristalloider Lösung gehalten, bevor die Messung (Schock) erfolgte. Das entnommene Blut konnte mittels Citrat-Phosphat-Dextrose in sterilen Transfusionsbeuteln konserviert werden (4R3615NM, Single Blood-Pack Unit 500-mL citrate phosphate-dextrose adenine-1 (0.14 ml/ ml Blut), Baxter, Round Lake, IL, USA).

Die Reperfusion erfolgte mit 60 % der entnommenen Blutvolumen und der doppelten Menge des entnommenen Blutvolumens in Form von kristalloider Lösung. Die Therapiegruppe (INO-1001 Gruppe) erhielt 5 Minuten vor der Reperfusion 2 mg*kg⁻¹ INO-1001 gelöst in 20 ml Glukose (5 %) intravenös als Bolus und danach eine Erhaltungsdosis des PARP-Inhibitors mit 1 mg*kg⁻¹*h⁻¹ gelöst in Glukose (5 %). Die Kontrollgruppe erhielt zur Reperfusion nur die Trägerlösung (Glukose 5 %) in gleicher Menge. Nach einer einstündigen Reperfusionszeit wurde der nächste Messzeitpunkt (1 h Rep.) erhoben. In der zweiten Stunde der Reperfusion erhielten die Tiere die gleichen entnommenen Blutvolumina als kristalloider Lösung. Danach erfolgte eine

Basisinfusion von $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ kristalloider Lösung. Nach 5 h Reperfusion wurde



der letzte Messzeitpunkt erhoben.

Abb. 2-6 Studienprotokoll (HS/ INO)

HS – hämorrhagischer Schock, Trägerlösung – Glucoselösung
n = 14 je 7 Tiere pro Gruppe

2.6 Datenverarbeitung und statistische Methoden

Die Messwerte wurden mittels JMP-Software (SAS Institute Inc., NC, USA) statistisch ausgewertet. Unterschiede zwischen einzelnen Messzeitpunkten innerhalb einer Gruppe wurden mit dem Tukey-Kramer-Test, zwischen den Gruppen mit dem Wilcoxon–Test ermittelt. Ein signifikanter Unterschied bestand bei $p < 0,05$. Die Ergebnisse wurden als Boxplots bzw. in Tabellenform als Mediane mit 25 % und 75 % Quartilen dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz der Kontrollgruppe lag zum Ausgangszeitpunkt bei 108 (106/113)/min und stieg in der Schockphase auf 219 (217/225)/min an. In der Reperfusionsphase fiel die Herzfrequenz nach der ersten Stunde auf 179 (162/180)/min und lag nach 5 h Reperfusion bei 142 (138/166)/min. Die Herzfrequenz der INO-1001-Gruppe lag zum Ausgangszeitpunkt bei 97 (89/110)/min und war vergleichbar mit dem der Kontrolltiere. In der Schockphase stieg die Herzfrequenz auf 204 (188/225)/min an. In der Reperfusionsphase war die Herzfrequenz nach 5 h niedriger als bei den Kontrolltieren 150 (128/175)/min bzw. 112 (100/121)/min).

Herzfrequenz (/min)	Ausgangswert	Schock	1h Reperfusion	5h Reperfusion
HS	108 (106/113)	219 (217/225)#	179 (162/180)#	142 (138/166)#
INO	97 (89/110)	204 (188/225)#	150 (128/175)#	112 (100/121)§

vs Ausgangswert, § vs. Kontrolle

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: je min

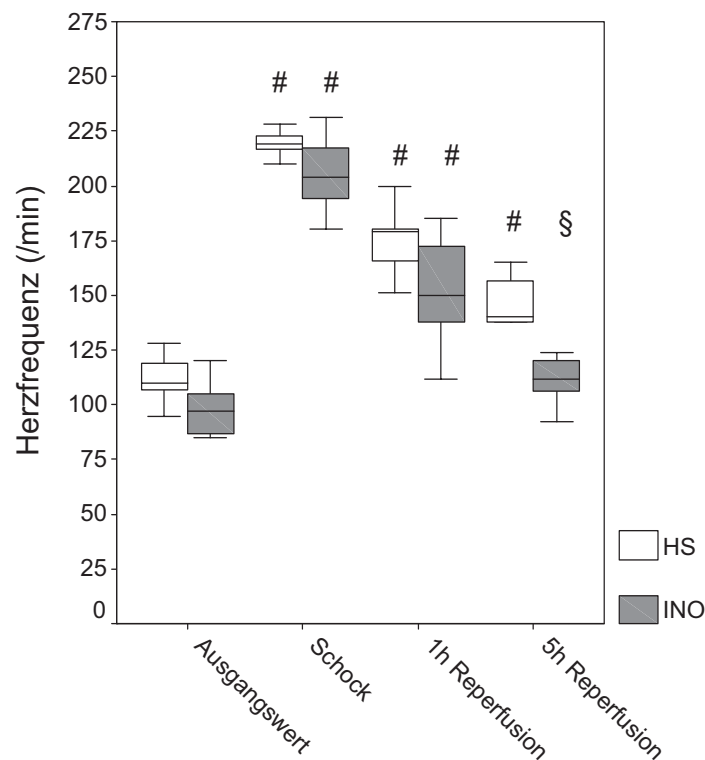


Diagramm 3-1: Herzfrequenz

Einheit: in /min; n = 14; Mittelwerte ± Standardabweichung, #/§: p < 0,05 vs. Ausgangswert (Ausgangswert= nach der Instrumentierung)
vs. Ausgangswert, § vs. Kontrolle

3.2 Mittlerer arterieller Blutdruck

Zum Beginn der Versuche lag der arterielle Mitteldruck (MAP) im für Schweine normotensiven Bereich. Beide Gruppen waren vergleichbar. In der Schockphase fiel der MAP wie im Studienprotokoll gefordert auf einen MAP von 40 mmHg in beiden Gruppen ab. In der Reperusionsphase erreichte der MAP wieder seinen Ausgangswert. Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden in der Reperusionsphase nicht.

Mittlerer arterieller Druck (mmHg)	Ausgangswert	Schock	1 h Reperfusion	5 h Reperfusion
HS	100 (92/100)	41 (39/41)#	85 (80/87)	90 (73/92)
INO	92 (88/98)	41 (40/42)#	87 (80/90)	96 (74/100)

vs Ausgangswert

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: Millimeter Quecksilbersäule

3.3 Herzzeitvolumen

Der Herzzeitvolumenindex (HI) der Kontrolltiere lag zum Ausgangswert bei 149 (121/151) ml*kg⁻¹*min⁻¹ und fiel während der Schockphase auf 47 (35/62) ml*kg⁻¹*min⁻¹ ab, stieg in der 1 h der Reperfusion auf 150 (122/179) ml*kg⁻¹*min⁻¹ an, lag aber nach 5 h mit 103 (94/108) ml*kg⁻¹*min⁻¹ im Vergleich zum Ausgangswert niedriger.

Bei den INO-1001 behandelten Tieren war der HI mit 146 (123/169) ml*kg⁻¹*min⁻¹ als Ausgangswert vergleichbar mit dem der Kontrolltiere. In der Schockphase fiel der HI auf 57 (52/59) ml*kg⁻¹*min⁻¹ ab. Auch hier stieg der HI nach 1 Stunde Reperfusion wieder auf 155 (145/187) ml*kg⁻¹*min⁻¹ und lag nach 5 Stunden Reperfusion bei 133 (123/142) ml*kg⁻¹*min⁻¹. Zu diesem Zeitpunkt unterschied sich der HI bei den INO-1001 behandelten Tieren deutlich von dem der Kontrolltiere aber nicht vom Ausgangswert.

Herzzeitvolumenindex (ml*kg ⁻¹ *min ⁻¹)	Ausgangswert	Schock	1h Reperfusion	5 h Reperfusion
Kontrolle	149 (121/151)	47 (35/62)#	150 (122/179)	103 (94/108)#
INO-1001	146 (123/169)	57 (52/59)#	155 (145/187)	133 (123/142)§

vs Ausgangswert, § vs. Kontrolle

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: Millimeter Quecksilbersäule

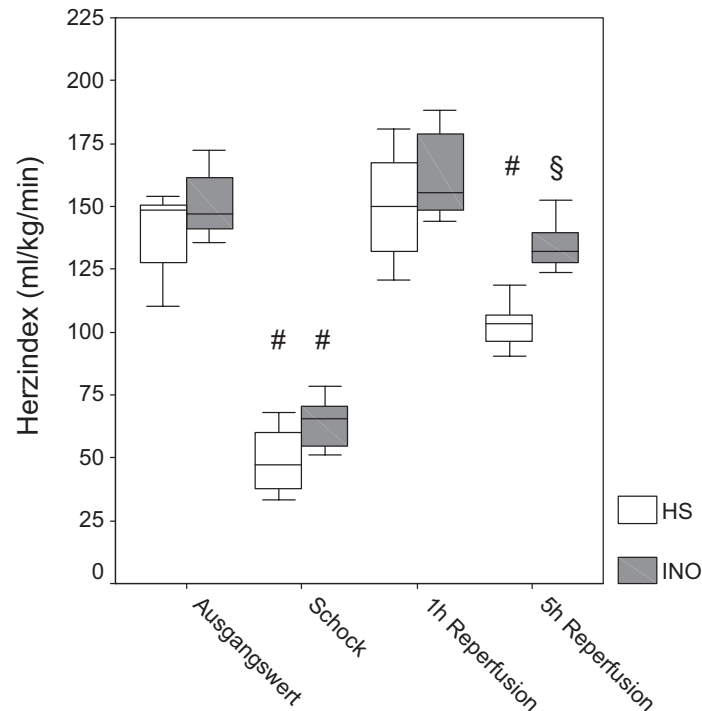


Diagramm 3-2: Herzindex

Einheit: in ml/kg/min; n = 14; Mittelwerte± Standardabweichung, #/§:

p < 0,05 vs. Ausgangswert (Ausgangswert= nach der Instrumentierung)

vs. Ausgangswert, § vs. Kontrolle

3.4 Intrathorakaler Blutvolumenindex

Der intrathorakale Blutvolumenindex (ITBI) war zum Anfang der Versuche in beiden Gruppen vergleichbar. Am Ende der Schockphase war er niedriger im Vergleich zu den Ausgangswerten. Zu den Zeitpunkten 1 h und 5 h Reperfusion entsprach der ITBI wieder dem Ausgangsbefund.

Intrathorakaler Blutvolumen-Index (ml*m ² *-1)	Ausgangswert	Schock	1 h Reperfusion	5 h Reperfusion
HS	1097 (983/1161)	653 (549/917)#	937 (869/1025)	861 (841/985)
INO	1055 (938/1105)	639 (607/671)#	896 (849/951)	860 (835/1044)

vs Ausgangswert

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: Milliliter je Quadratmeter

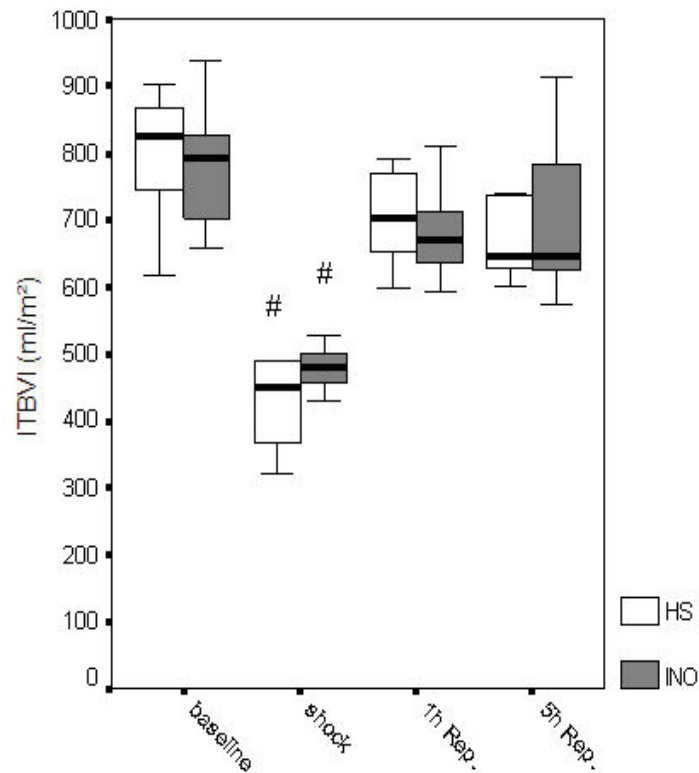


Diagramm 3-3 Intrathorakaler Blutvolumenindex

Einheit: in ml; n = 14; Mittelwerte± Standardabweichung, #/§: p < 0,05 vs. Ausgangswert (Ausgangswert= nach der Instrumentierung) # vs. Ausgangswert, § vs. Kontrolle

3.5 Entnommene Blutmenge

Um einen angestrebten MAP von 40 mmHg in der Schockphase zu erreichen, wurden in beiden Gruppen vergleichbare Mengen Blut entnommen.

entnommene Blutmenge (ml/kg)	Schock
HS	37 (36/39)
INO	40 (36/43)

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: Milliliter je Körpergewicht

3.6 Hämoglobin

Die Hämoglobinkonzentration in beiden Tiergruppen blieb über die gesamte Zeit der Untersuchung konstant.

Hämoglobin (mmol/l)	Ausgangswert	Schock	1 h Reperfusion	5 h Reperfusion
HS	5,8 (5,4/6,5)	5,7 (4,7/6,1)	5,9 (4,8/6,2)	5,8 (5,5/5,9)
INO	6,3 (5,9/6,3)	6,3 (4,8/6,5)	5,4 (5,1/6,3)	5,9 (4,8/6,6)

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: Millimol je Liter

3.7 Arterieller Sauerstoffpartialdruck

Der arterielle Sauerstoffpartialdruck (paO₂) war über den gesamten Versuchszeitraum innerhalb der vorgegeben physiologischen Grenzen (12,6 – 15,3 kPa).

paO ₂ (kPa)	Ausgangswert	Schock	1 h Reperfusion	5 h Reperfusion
HS	14,2 (11,7/15,9)	13,4 (10,6/15,2)	14,6 (12,1/15,5)	13,6 (11,9/15,2)
INO	14,2 (13,3/14,5)	13,8 (13,0/14,7)	12,5 (11,7/13,6)	13,6 (12,2/14,0)

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: kilo Pascal

3.8 Arterieller Kohlendioxidpartialdruck

Der arterielle Kohlendioxidpartialdruck war über den gesamten Versuchszeitraum innerhalb der vorgegebenen physiologischen Grenzen (4,5 – 5,6 kPa).

paCO ₂ (kPa)	Ausgangswert	Schock	1 h Reperfusion	5 h Reperfusion
HS	4,9 (4,8/4,9)	4,8 (4,1/5,0)	5,5 (5,0/5,7)	5,0 (4,8/5,1)
INO	4,7 (4,6/4,9)	4,8 (4,8/5,2)	5,9 (5,1/6,0)	4,4 (4,4/4,5)

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: kilo Pascal

3.9 Blutflüsse in der Arteria hepatica und Vena portae

3.9.1 Blutfluss in der Arteria hepatica

Der Blutfluss in der Arteria hepatica zu Beginn der Untersuchung war in beiden Untersuchungsgruppen vergleichbar. In der Schockphase fiel der Blutfluss um ca. 60 % ab. In der Reperfusionszeit erreichte der Blutfluss in beiden Gruppen wieder das Ausgangsniveau. Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden zu keinem Messzeitpunkt.

Arteria Hepatica Blutfluss Index (ml*kg ⁻¹ *min ⁻¹)	Ausgangswert	Schock	1 h Reperfusion	5 h Reperfusion
HS	6 (6/6)	2 (2/4)#	6 (4/7)	6 (6/7)
INO	6 (5/6)	3 (2/4)#	7 (6/8)	7 (6/9)

vs Ausgangswert

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: Milliliter je Kilogramm und Minute

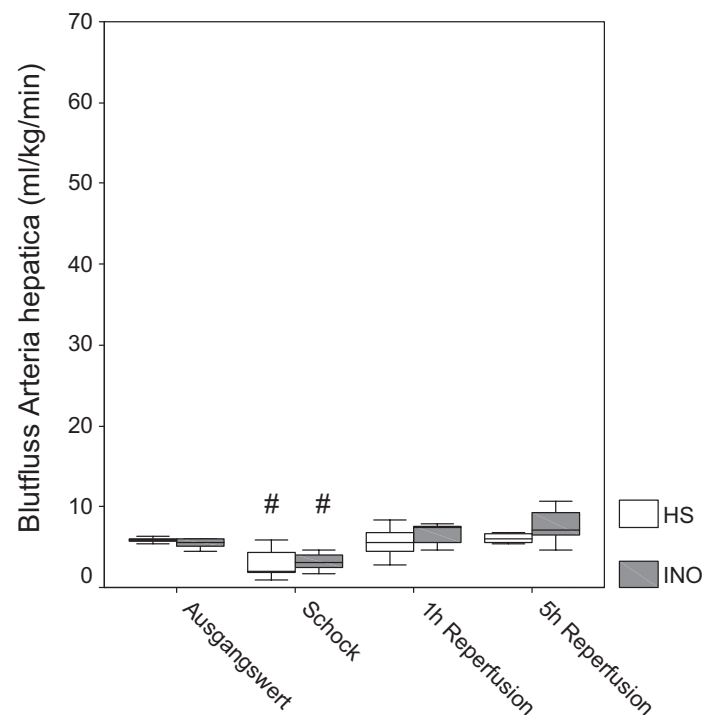


Diagramm 3-4: Blutfluss in der Arteria hepatica

Einheit: in ml/kg/min; n = 14; Mittelwerte ± Standardabweichung, #/\$:

p < 0,05 vs. Ausgangswert (Ausgangswert= nach der Instrumentierung)

vs. Ausgangswert, § vs. Kontrolle

3.9.2 Blutfluss in der Vena portae

Der Blutfluss in der Vena portae zu Beginn der Untersuchung war in beiden Untersuchungsgruppen vergleichbar. In der Schockphase fiel der Blutfluss um ca. 60 % ab. In der frühen Reperusionsphase scheint der Blutfluss bei den Kontrolltieren tendenziell erhöht. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. In der späteren Reperusionsphase erreicht der Blutfluss in beiden Gruppen wieder das Ausgangsniveau. Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden zu keinem Messzeitpunkt.

Vena Portae Blutfluss Index ($\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	Ausgangswert	Schock	1 h Reperfusion	5 h Reperfusion
HS	29 (26/35)	8 (5/12)#	40 (33/50)	31 (23/41)
INO	29 (23/30)	10(8/15)#	33 (25/45)	32 (22/36)

vs Ausgangswert

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: Milliliter je Kilogramm und Minute

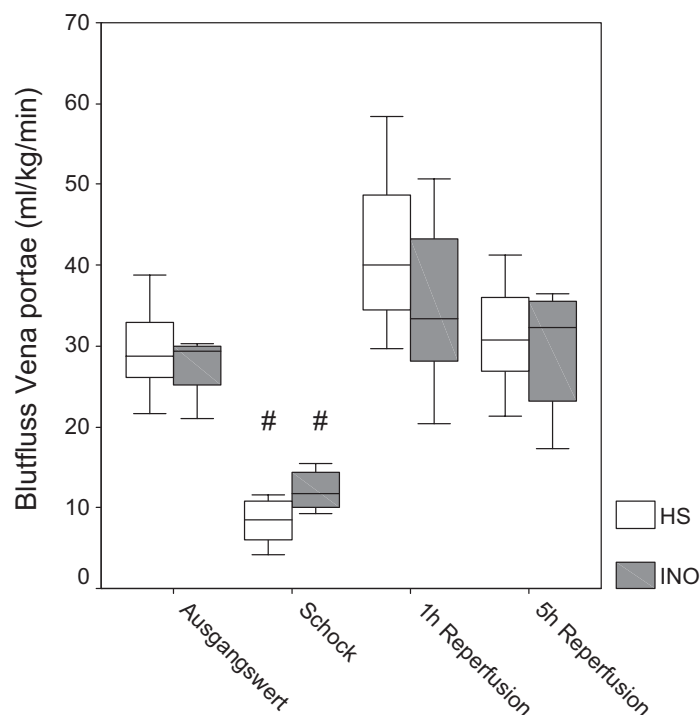


Diagramm 3-5: Blutfluss in der Vena portae

Einheit: in ml/kg/min ; n = 14; Mittelwerte \pm Standardabweichung, #/§:

p < 0,05 vs. Ausgangswert (Ausgangswert= nach der Instrumentierung)

vs. Ausgangswert, § vs. Kontrolle

3.9.3 Gesamter hepatischer Blutfluss

Aus dem Blutfluss der Arterie hepatica und der Vena portae lässt sich der gesamte Leberblutfluss berechnen, der sich entsprechend der Einzelblutflüsse verhält. Zu Beginn der Untersuchung war der gesamte Leberblutfluss in beiden Untersuchungsgruppen vergleichbar. Nach 60 min Schock war der Blutfluss um ca. 60 % gefallen. In der gesamten Reperfusionphase war der gesamte Leberblutfluss beiden Gruppen vergleichbar und entsprach dem Ausgangswert.

gesamter Leberblutfluss Index ($\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	Ausgangswert	Schock	1 h Reperfusion	5 h Reperfusion
HS	36 (32/41)	11 (7/14)#	45 (41/56)	37 (30/47)
INO	35 (29/38)	14(10/19)#	41 (30/53)	39 (29/44)

vs Ausgangswert

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: Milliliter je Kilogramm und Minute

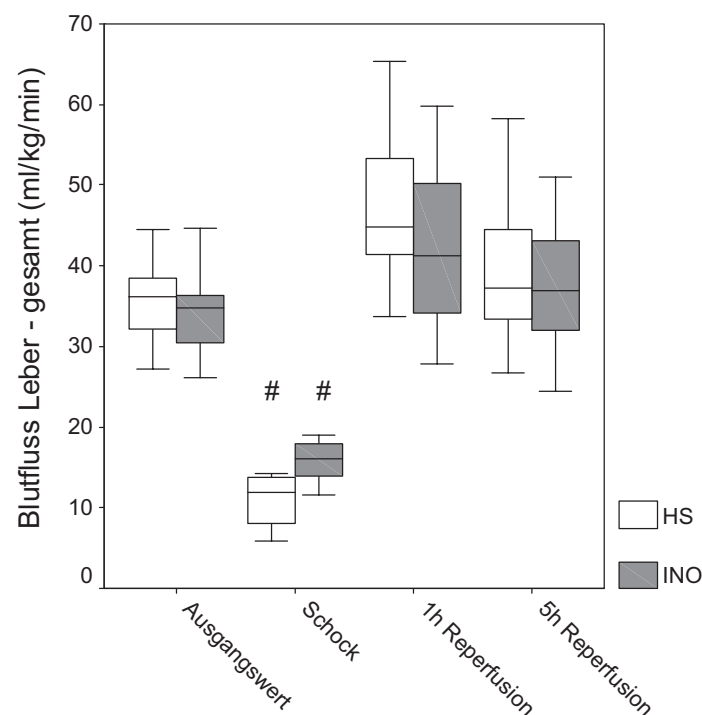


Diagramm 3-6: gesamter Leberblutfluss

Einheit: in ml/kg/min; n = 14; Mittelwerte \pm Standardabweichung, #/\$:

p < 0,05 vs. Ausgangswert (Ausgangswert= nach der Instrumentierung)

vs. Ausgangswert, § vs. Kontrolle

3.10 Sauerstoffangebot der Leber

3.10.1 Arteria hepatica

Das Sauerstoffangebot in der Arteria hepatica war in beiden Gruppen zu Beginn der Versuche gleich. In der Schockphase fiel der Wert in beiden Gruppen um mehr als die Hälfte ab. In der anschließenden Reperfusionsphase stieg das Sauerstoffangebot in beiden Gruppen wieder auf das Ausgangsniveau an.

Sauerstoffangebot Arterie Hepatica Index (ml/kg)	Ausgangswert	Schock	1 h Reperfusion	5 h Reperfusion
HS	9 (9/12)	4 (3/8)#	10 (8/10)	10 (8/12)
INO	9 (9/11)	4(4/8)#	11 (9/13)	12 (11/15)

vs Ausgangswert

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: Milliliter je Kilogramm

3.10.2 Vena portae

Das Sauerstoffangebot der Vena portae unterschied sich im Ausgangszeitpunkt bei beiden Gruppen nicht. Nach der Schockphase fiel das Sauerstoffangebot um rund 90 % ab. In der Reperfusion stieg das Sauerstoffangebot bei beiden Gruppen wieder auf den Ausgangswert an. Unterschiede bestanden zwischen den Gruppen bzw. zum Ausgangswert nicht.

Sauerstoffangebot Vena Portae Index (ml*kg ⁻¹)	Ausgangswert	Schock	1 h Reperfusion	5 h Reperfusion
HS	36 (35/45)	3 (2/5)#	56 (34/63)	39 (29/43)
INO	36 (26/42)	4(4/6)#	42 (33/49)	37 (27/41)

vs Ausgangswert

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: Milliliter je Kilogramm

3.10.3 Gesamtes Sauerstoffangebot in der Leber

Das gesamte Sauerstoffangebot der Leber unterschied sich im Ausgangszeitpunkt bei beiden Gruppen nicht. In der Schockphase fiel das Sauerstoffangebot um rund 80 % ab. In der Reperfusion stieg das Sauerstoffangebot bei beiden Gruppen wieder auf den Ausgangswert an. Unterschiede bestanden zwischen den Gruppen bzw. zum Ausgangswert nicht.

Sauerstoffangebot Leber gesamt Index (ml*kg ⁻¹)	Ausgangswert	Schock	1h Reperfusion	5 h Reperfusion
HS	48 (46/54)	7 (4/10)#	64 (45/72)	64 (45/72)
INO	46 (35/56)	10 (8/13)#	52 (43/62)	52 (44/62)

vs Ausgangswert

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: Mililiter je Kilogramm

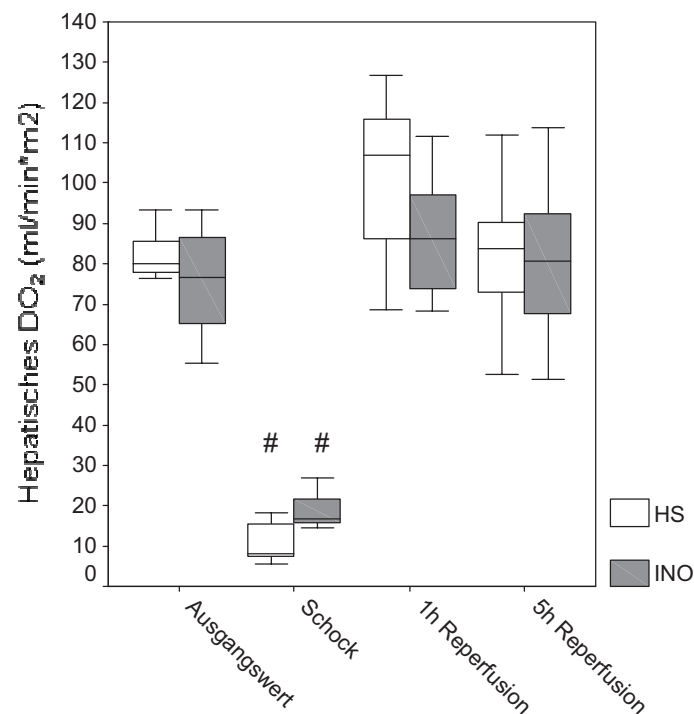


Diagramm 3-7: gesamtes Lebersauerstoffangebot

Einheit: in ml/kg/min; n = 14; Mittelwerte± Standardabweichung, #/§:
p < 0,05 vs. Ausgangswert (Ausgangswert= nach der Instrumentierung)

vs. Ausgangswert, § vs. Kontrolle

3.11 Sauerstoffverbrauch der Leber

Auch bei der Betrachtung des Sauerstoffverbrauches der Leber liegen die Werte der Kontroll- und der INO-Gruppe ohne großen Unterschied über den Versuchszeitraum beieinander. In der Schockphase sank der Sauerstoffverbrauch in beiden Gruppen um die Hälfte ab. In der Reperusionsphase erreichte der Sauerstoffverbrauch der Leber in beiden Gruppen wieder das Ausgangsniveau.

Sauerstoffverbrauch Leber Index (ml*kg ⁻¹)	Ausgangswert	Schock	1 h Reperfusion	5 h Reperfusion
HS	10 (6/11)	4 (3/6)#	12 (11/14)	11 (9/13)
INO	12 (9/16)	5(4/9)#	11 (10/16)	10 (8/14)

vs Ausgangswert

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: Milliliter je Kilogramm

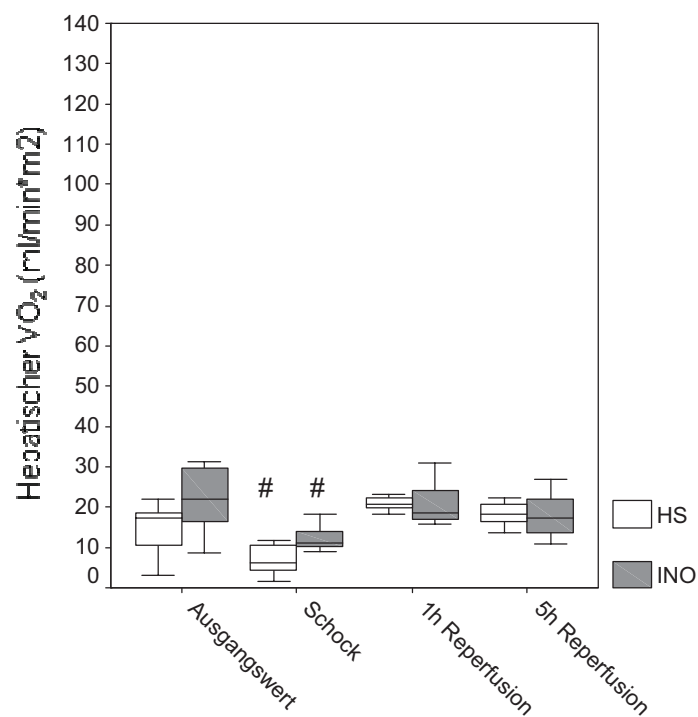


Diagramm 3-8: Sauerstoffverbrauch der Leber

Einheit: in ml/kg; n = 14; Mittelwerte± Standardabweichung, #/§: p < 0,05 vs. Ausgangswert (Ausgangswert= nach der Instrumentierung)
vs. Ausgangswert, § vs. Kontrolle

3.12 Oberflächenoxygenierung der Leber

Der Sauerstoffpartialdruck der Leberoberfläche lag zum Ausgangszeitpunkt bei beiden Gruppen auf einem ähnlichen Niveau. In der Schockphase fiel die Leberoberflächenoxygenierung in beiden Gruppen um rund ein Drittel ab. In der frühen Phase der Reperfusion stieg die Leberoberflächenoxygenierung in beiden Gruppen wieder auf das Ausgangsniveau an. Nach 5 h Reperfusion war die Leberoberflächenoxygenierung in den INO-1001 behandelten Tieren unverändert auf dem Ausgangsniveau, wohingegen die der Kontrolltiere wieder auf das Niveau der Schockphase abgefallen war.

Leberoberflächen pO ₂ (mmHg)	Ausgangswert	Schock	1 h Reperfusion	5 h Reperfusion
HS	75 (66/82)	56 (37/65)#	61 (55/72)	52 (47/57)#
INO	70 (65/76)	50 (34/59)#	63 (57/68)	67 (62/69)§

vs Ausgangswert, § vs. Kontrolle

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: Millimeter Quecksilbersäule

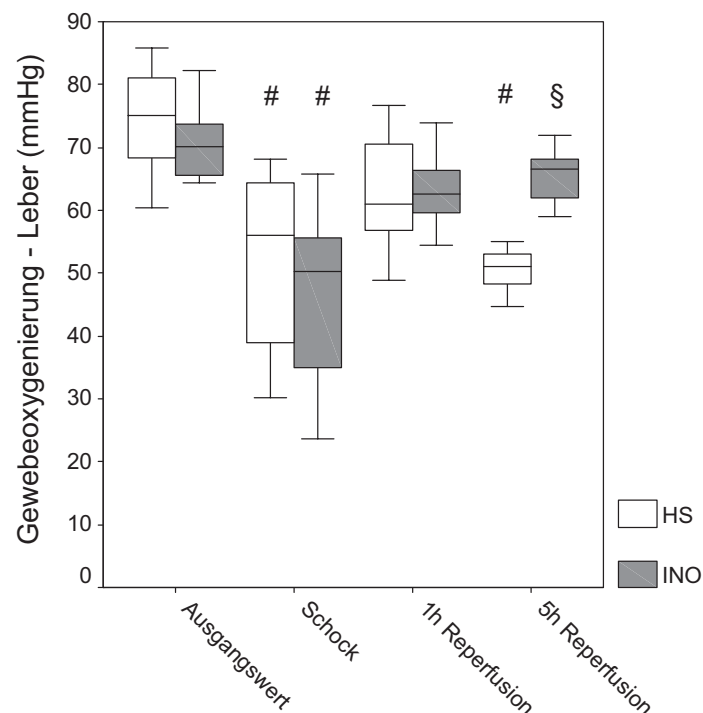


Diagramm 3-9: Leberoberflächenoxygenierung

Einheit: in mmHg; n = 14; Mittelwerte± Standardabweichung, #/§: p < 0,05 vs. Ausgangswert (Ausgangswert= nach der Instrumentierung)

vs. Ausgangswert, § vs. Kontrolle

3.13 Aspartat-Aminotransferase Konzentration

Die Aspartat-Aminotransferase (AST) war zum Ausgangszeitpunkt in beiden Gruppen vergleichbar. Nach der Schockphase und der fünfstündigen Reperusionsphase lag der Wert bei der Kontrollgruppe mit 134 (106/146) U/I deutlich über dem Ausgangswert und unterschied sich auch von dem Wert der INO-Gruppe, der bei 64 (57/68) U/I lag. Dieser war jedoch auch höher als der Ausgangswert.

Aspartataminotransferase (U/I)	Ausgangswert	5 h Reperfusion
HS	47 (45/59)	134 (106/146)#
INO	50 (43/57)	64 (57/68)#§

vs Ausgangswert, § vs. Kontrolle

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14;
Einheit: Units je Liter

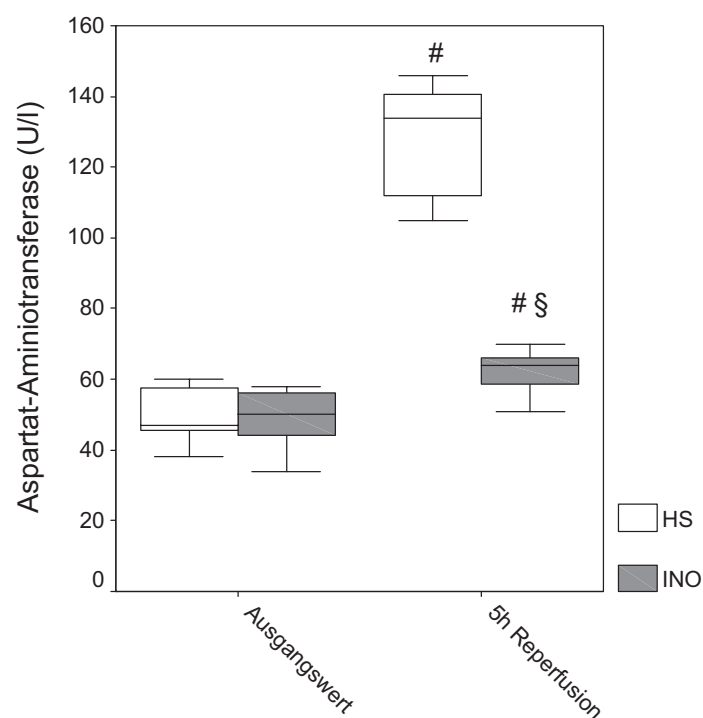


Diagramm 3-10: Aspartat-Aminotransferase Konzentration

Einheit: in U/I; n = 14; Mittelwerte± Standardabweichung, #/§: p < 0,05 vs. Ausgangswert (Ausgangswert= nach der Instrumentierung)
vs. Ausgangswert, § vs. Kontrolle

3.14 Laktat-Konzentration

Bei der Laktatkonzentration im Blut gab es zwischen den beiden Gruppen keine nennenswerten Unterschiede. Im Schock und nach einer Stunde Reperfusion lagen die Konzentrationen signifikant über dem Ausgangswert. Nach fünf Stunden Reperfusion sank der Wert bei beiden Tiergruppen wieder auf den Ausgangswert.

Laktat (mmol*l ⁻¹)	Ausgangswert	Schock	1 h Reperfusion	5 h Reperfusion
HS	2 (2/3)	11 (9/11)#	10 (9/11)#	2 (2/3)
INO	2 (2/4)	9(7/10)#	10 (9/10)#	2 (2/4)

vs Ausgangswert

HS – hämorrhagische Schock Gruppe; INO – INO-1001 Gruppe; n = 14; Einheit: mmol je Liter

3.15 Histologie

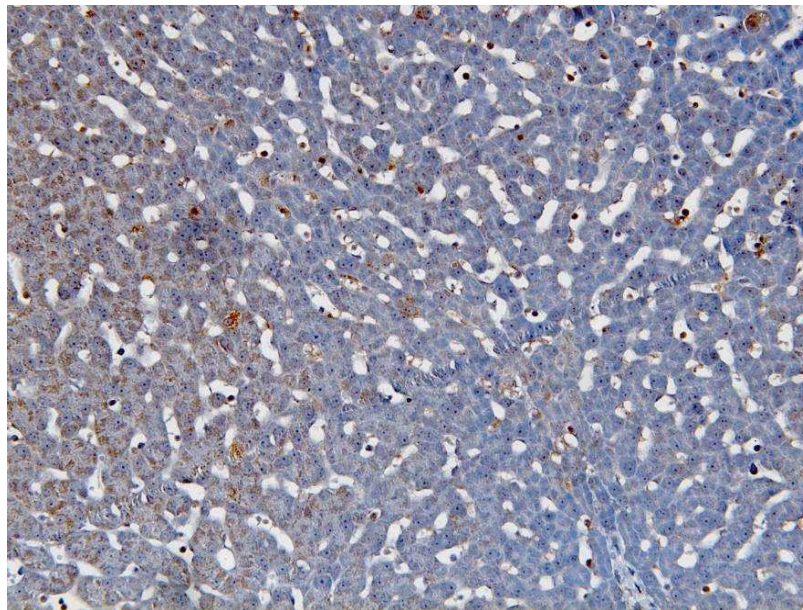


Abb. 3-1 Histologie Leber, PARP-Färbung, HS ohne PARP Inhibitor

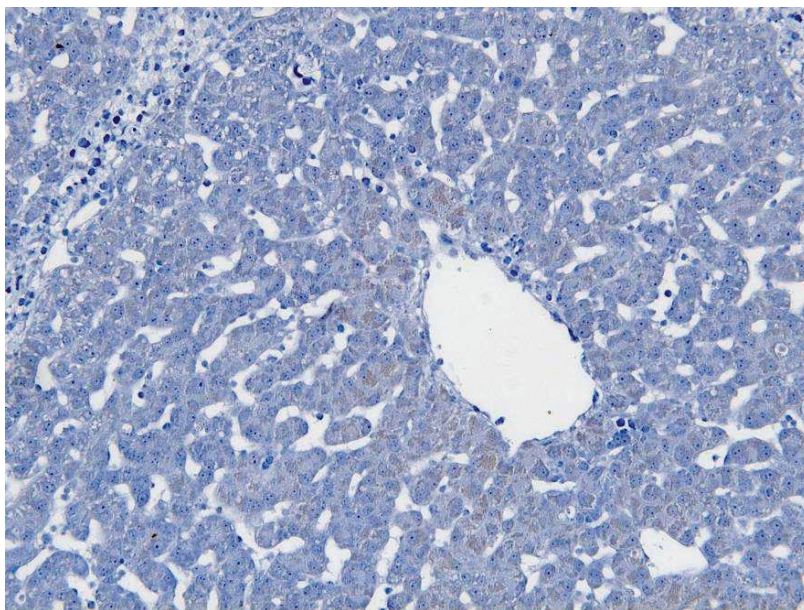


Abb. 3-2 Histologie Leber, PARP-Färbung, HS mit INO 1001

Die PARP-aktivierten Zellen in den histologischen Schnitten der Leber sind mit einem markierten Antikörper gegen PARP angefärbt. Braune Areale weisen eine hohe PARP-Aktivität auf. Bei den INO-1001 behandelten Tieren war die PARP-Aktivität im Lebergewebe deutlich niedriger. Die semiquantitative Auszählung von 10 Gesichtsfeldern pro Leber pro Versuchstier waren bei den Kontrolltieren rund 60 % der Gesichtsfelder teilweise bis stark positiv. Etwa 40 % waren negativ. In den INO-1001 behandelten Tieren war eine deutliche Reduktion der PARP-Aktivität im Lebergewebe zu beobachten. So zeigten fast Dreiviertel aller Gesichtsfelder keine PARP-Aktivität. Nur etwa 3 % der Gesichtsfelder waren positiv.

Leber				
	negativ	teilweise positiv	positiv	stark positiv
Kontrolle	41,53	36,22	15,12	7,13
INO-1001	74,57	22,57	2,86	0

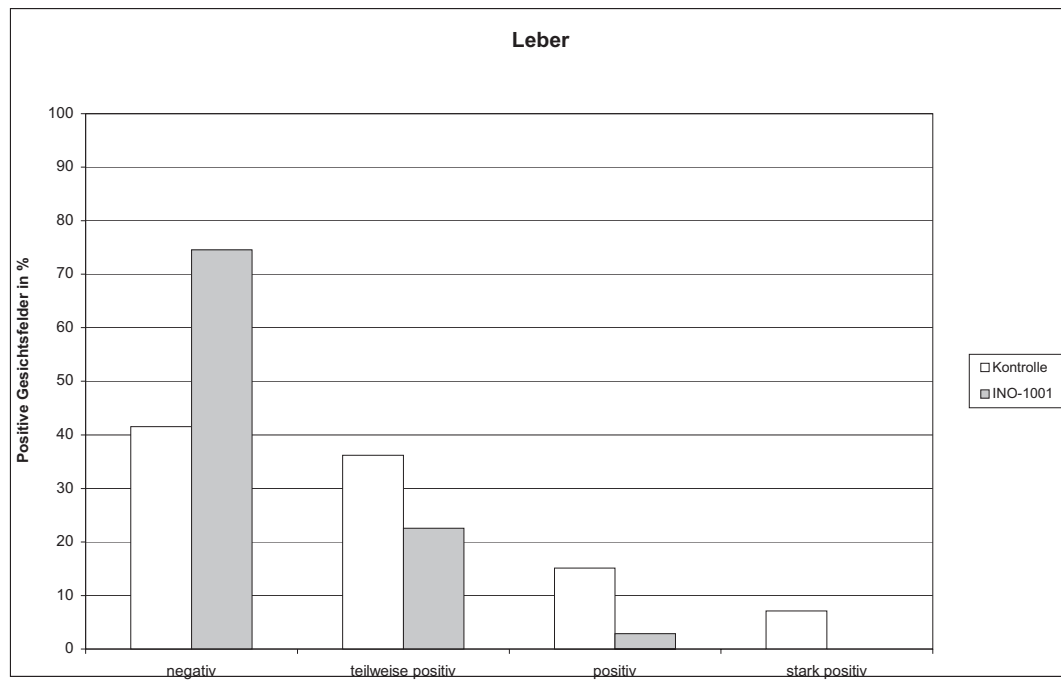


Diagramm 3-11: Histologische Auswertung

n = 14; nach Gesichtsfeldern, je nach Aktivierungsgrad

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Experimentelles Modell

4.1.1.1 Tierspezies

Das Schwein als Versuchstier zu wählen, basiert auf folgenden Überlegungen:

- Um die gewonnen Ergebnisse auf den Menschen zu übertragen, ist ein Organismus vorzuziehen, welcher vergleichbare anatomische und physiologische Verhältnisse [12], gerade beim Herz-Kreislauf-System [14, 171] und dem Gastrointestinaltrakt [3], hat. Auch die hepatische Enzymausstattung sollte eine große Ähnlichkeit mit dem Menschen haben [142], was beim Schwein der Fall ist.
- Andere Tiermodelle sind weniger geeignet, da bei Kleintierarten (Ratte) nicht die ausreichende Größe für die Platzierung der benötigten Messkatheter und Flussmessköpfe besteht und daneben auch die anatomischen und physiologischen Gegebenheiten zum Menschen stark variieren. Hunde und Katzen sind aufgrund ihres artspezifischen venösen Blutpoolings im Leber- und Milzbereich [113] für Untersuchungen zum hämorrhagischen Schock schlechter geeignet als Schweine.

4.1.1.2 Anästhesie

Bei Schweinen ist eine adäquate Prämedikation notwendig, da sie empfindlich auf Stress reagieren. Dies kann durch vergleichsweise geringe Schmerzreize hervorgerufen werden, was zu einer drastischen Anhebung des Sympathikustonus führt [176]. Im Extremfall kann es zu einem, dem malignen Hyperthermie ähnlichem Bild, dem sogenannten „porcine stress syndrom“, kommen [156]. Für die vorliegende Untersuchung wurden die Tiere mit Midazolam und Ketamin prämediziert. Die Einleitung der Narkose erfolgte mit Fentanyl, Ketamin, Rocuronium und Flunitrazepam. Die Narkoseaufrechterhaltung erfolgte mit Ketamin, Flunitrazepam und Rocuronium.

Die geringe Beeinflussung der Splanchnikusperfusion war das entscheidende Kriterium für die Auswahl der Pharmaka.

- Ketamin:

Das Hypnotikum Ketamin besitzt den Vorteil, dass es zum klassischen Hypnotikum eine analgetische Wirkungskomponente hat.

Einige Studien zeigten, dass es zu einer Stimulation vom Herz-Kreislauf-System und so zu einem Anstieg von Herzfrequenz, Blutdruck und HZV kam [68, 155, 159, 172]. Dieses Phänomen trat jedoch nur in den ersten 30 Minuten nach Applikationsbeginn auf, so dass auf die Messwerte, die nach mehreren Stunden des steady-state erhoben wurden, keine Beeinflussung bestand. Somit beeinflusst das Ketamin, im Gegensatz zu Barbituraten, die Splanchnikusperfusion nur gering [1, 35, 153, 154].

- Rocuronium:

Rocuronium ist ein nicht depolarisierendes Muskelrelaxantium. Die Relaxierung diente zum einen zur Intubation, zum anderen um einen Sauerstoffverbrauch durch Muskelzittern zu verhindern.

- Fentanyl:

Fentanyl ist ein Opioid und wird als potentes Analgetikum perioperativ verwendet. Bei niedriger Dosierung kann es sympathikusstimulierend, [75], bei hohen Dosen aber auch kreislaufdepressiv sein [40].

Fentanyl wurde nur zur Intubation und Präparation verabreicht. Es beeinflusst die Leberdurchblutung nur geringfügig [48].

- Flunitrazepam:

Das langwirksame Benzodiazepin Flunitrazepam zeichnet sich durch eine hohe hämodynamische Stabilität aus. Daten zur Beeinflussung der Leberdurchblutung liegen nicht vor.

Alle zur Prämedikation und Narkose verwendeten Pharmaka wurden dahingehend ausgewählt, dass die Splanchnikusdurchblutung und der

Sauerstoffverbrauch unbeeinflusst bzw. eine kardiozirkulatorisch depressive Wirkung ausgeschlossen werden kann.

4.1.1.3 Beatmung

Die Tiere wurden druckkontrolliert beatmet, um für die Dauer der Versuche konstante physiologische Bedingungen zu halten. Hypoxie [65, 83, 104] oder Hyperoxie [65] aber auch Hypokapnie [44, 49, 52, 66, 174] oder Hyperkapnie [44, 64, 174] können die Durchblutung des Darmes oder der Leber beeinträchtigen. Durch die Kontrolle und Aufzeichnung der arteriellen Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrücke während der einzelnen Messzeitpunkte konnten wir zeigen, dass die Tiere beider Gruppen normoxygeniert und normoventiliert waren. Trotzdem ist anzumerken, dass eine kontrollierte Beatmung den Blutfluss des Splanchnikusgebietes im Gegensatz zur Spontanatmung reduziert [13, 19, 20, 22, 43, 105].

In früheren Versuchen wurde nachgewiesen, dass ein positiver endexpiratorischer Druck die Splanchnikusdurchblutung beeinträchtigt. Dies ist jedoch abhängig vom Volumenstatus des Versuchstieres. Iber et al. zeigten [67], dass bei konstantem normwertigen intrathorakalem Blutvolumen keine Verringerung der Splanchnikusperfusion nachweisbar ist. Auch neuere Studien konnten diese Aussage unterstützen und wiesen darauf hin, dass ein PEEP bis 10 mmHg keine Veränderung in der Leberdurchblutung zur Folge hat [4, 88, 131]. Damit ist ein PEEP von bis zu 7 mmHg in unseren Versuchen zu rechtfertigen, um eine Atelektasenbildung zu verhindern und eine ausreichende Oxygenierung sicherzustellen.

4.1.1.4 Präparation

Zur Anlage von Flussmessköpfen und Kathetern waren eine ausgedehnte Laparatomie und die Mobilisierung von intraabdominalen Gefäßen und Darmabschnitten notwendig. Die hieraus resultierende Irritation der glatten Muskulatur des Darmes kann eine Freisetzung von vasoaktiven Mediatoren zur Folge haben, was die Durchblutung des Splanchnikusgebietes beeinträchtigt.

Die Datenerhebung erfolgte entsprechend eines Studienprotokolls nach der Präparation und Ruhephase, so dass Beeinträchtigung der Perfusion in allen Gruppen im Sinne eines systematischen Fehlers wiederfinden. [16, 50, 54, 136].

Damit die Messungen nicht zu stark von den Beeinflussungen verändert wurden, erfolgte die Präparation in tiefer Narkose mit möglichst kurzer OP-Dauer. Neben diesen Maßnahmen gab es eine Ruhephase vor dem ersten Messzeitpunkt, die zur Stabilisierung diente.

Ein weiteres Problem bei der offenen Präparationsweise entsteht durch die Auskühlung, was zu Veränderungen in der Durchblutung und des Stoffwechsels der Leber führen kann [116]. Die daraus folgenden Bedingungen waren die Vorwärmung des Operationssaales auf 25° C, die Verwendung körperwarmer Infusionen, die Lagerung des Tieres auf einer Wärmematte, das Abdecken der mobilisierten Bauchorgane mittels angefeuchteter warmer Tücher und das Zudecken des Tieres mit trockenen Tüchern während der Stabilisierungsphase und zwischen den Messzeitpunkten.

4.1.2 Messmethoden

4.1.2.1 Herzzeitvolumen

Herzzeitvolumenmessung erfolgten nach der Thermodilutionsmethode [39, 45], die heute ein Standard in der Intensivmedizin ist. Zur Errechnung des Mittelwertes wurden drei Messungen verwendet, die um weniger als 10 % vom errechneten Mittelwert abweichen durften. So wurde sichergestellt, repräsentative Werte zu erhalten, die nicht durch Ausreisser beeinflusst werden.

4.1.2.2 Blutflussmessung

Die Verwendung von Ultraschallflussmessköpfen ist zwar ein invasives Verfahren, stellt aber den „Goldstandard“ zur Messung von Blutflüssen dar. Andere Methoden, wie die Verwendung von elektromagnetischen Flussmessköpfen [53, 59] oder die Dopplersonographie, sind weitaus ungenauer und bzw. bei der Dopplersonographie [59] sehr benutzerabhängig.

4.1.2.3 Oberflächen-pO₂-Messung

Die Mehrdrahtoberflächenelektrode ist auch heute noch der „Goldstandard“ bei der Messung der Gewebeoxygenierung. Dabei können Störungen in der Mikrozirkulation schon vor Veränderungen von Parametern der systemischen Perfusion beobachtet werden [77, 78]. Gegenüber der Messung mit Mikrostichelektroden bleiben die

Elektroden vor Kontamination mit Eiweißablagerungen, welche die Messgenauigkeit herabsetzen können [95], durch eine auf der Oberfläche befindliche Teflonmembran geschützt [78]. Zudem erfolgt die Messung ohne Schädigung des Gewebes durch Mikrotraumen, Hämatome oder lokale Mikrozirkulationsstörungen [32, 80]. Selbst das Gewicht des Messkopfes ist sehr gering, wodurch keine Druckschädigungen oder Ischämien an der Messstelle zu erwarten sind [32, 78, 96].

Die Funktion der Elektrode beruht auf die elektrochemische Reduktion von Sauerstoff durch eine Negativspannung, welche bei der Edelmetallelektrode angelegt wird.

Damit die Messungenauigkeiten so gering wie möglich gehalten wurden, gab es mehrere Vorbereitungen. Zum einen wurde die Elektrodenoberfläche gereinigt, damit die Polarisationsspannung, die -700 mV betrug, konstant blieb. Für eine gleichmäßige Polarisationschicht betrug die Vorlaufzeit der Elektrode mindestens eine Stunde [147]. Daneben gab es vor jeder Messung eine Zweipunktkalibrierung, die bei 21 % und 0 % Sauerstoffpartialdruck und einer Temperatur von 37° C stattfand. Zum anderen wurde eine Messkopfhalterung verwendet, die einen festen Kontakt mit der Leberoberfläche gewährleistete, sowie den Einfluss von der Seite kommenden Sauerstoff minimierte und die Messung nicht verfälschte [76].

Die grafische Auswertung der aufgenommenen Daten erfolgte durch eine pO₂-Histogrammdarstellung. Sie erlaubte die Beurteilung der hohen und gleichzeitig auch der niedrigen pO₂-Werte, die im Gewebe vorherrschten, so dass differenzierte Aussagen über die Gewebeoxygenierung machbar sind [78, 96, 97, 147].

Die Frage, die bei dieser Art der Messung sich stellt, ist wie weit der gemessene Oberflächensauerstoffpartialdruck auch den pO₂-Wert der tieferen Gewebeschichten widerspiegelt.

In älteren Studien wurde darüber berichtet, dass es eine homogene Perfusion innerhalb und zwischen den Leberlappen besteht [55]. In späteren Studien, die mit Laser-Doppler-Flow-Technik [8] bzw. mit H₂-Clearance [53] durchgeführt wurden, zeigten eine inhomogene Durchblutung, wobei die an der Oberfläche registrierten Werte eher den Anteil der arteriellen Versorgung darstellten, als die der gesamten Durchblutung. So zeigen die neueren Studien, dass die kapselnahen Bereiche stärker perfundiert sind und dass die Oberfläche nicht unbedingt die Oxygenierung der tieferen Schichten widerspiegelt [91]. Darum sollte die Interpretation der aufgenommenen

Werte immer im Zusammenhang mit anderen hepatischen Oxygenierungsparametern erfolgen.

Eine Limitierung der Oberflächenpartialdruckmessung an der Schweineleber stellt die arterialisierte Leberkapsel dar. Kleinere Veränderungen des Oberflächenpartialdrucks können durch die Kapsel nicht erfasst werden bzw. es werden falsch hohe Werte gemessen. Jedoch ist die Mehrdrahtoberflächenelektrode in der Lage starke Veränderungen des Sauerstoffpartialdrucks im Lebergewebe trotz der Leberkapsel zu detektieren.

Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung der Oxygenierungsparameter ist die Benutzung von dem oben erwähnten Laser-Doppler-Flow-Messgerät, welches die Mikrozirkulation durch die Veränderung der Lichtreflexion an bewegten Erythrozyten misst. Jedoch sind die aufgenommenen Werte keine Absolutwerte sondern relative Änderung der Durchblutung [2, 98, 139]. Des weiteren kann die Spektrometrie genannt werden, mit der die intrakapilläre Sauerstoffsättigung erfasst wird und die Wasserstoff-Clearance-Technik, die ebenfalls Aufschluss der lokalen Durchblutung gibt [41, 89]. Wobei letztere den beiden erst genannten überlegen sein soll [99].

Da es sich bei allen Methoden, auch der von uns angewandten, um invasive bzw. semiinvasive Verfahren handelt, werden im klinischen Alltag die laborchemischen Parameter verwendet, die Rückschlüsse zu Perfusion und Oxygenierung zulassen. Da sich die Werte aber erst bei zellulären bzw. subzellulären Schäden bemerkbar machen und die Kompensationsmechanismen ausfallen, ist nur eine generelle Einschätzung der klinischen Lage möglich.

4.1.2.4 Laborparameter

Um die Leberfunktion genau zu erfassen und im Bereich von zellulärer und subzellulärer Ebene Störungen zu erkennen, wurde die Plasmakonzentration von AST bestimmt.

Die Aspartataminotransferase (AST) ist zu 30 % im Zytoplasma und die restlichen 70 % an mitochondriale Strukturen gebunden. Eine höhere Konzentration an ASAT findet man in der Leber, aber auch im Herz- und Skelettmuskel. Je nachdem was für eine Schädigung auftritt, weist das Plasma eine bestimmte Höhe der Enzymaktivität und ein Enzymmuster auf. Die Enzymaktivitätshöhe hängt von der Größe des

geschädigten Parenchymgewebes ab. Ein Auffinden von mitochondrial gebundener ASAT zeigt eine stärkere Schädigung von Hepatozyten auf.

Die Alaninaminotransferase (ALT), ein rein zytoplasmatisches Enzym, ist für die Leberdiagnostik nur bei den Menschen sowie bei Hund und Katze zu verwenden. Bei anderen Tierarten ist sie eher unspezifisch. Aufgrund ihres Vorkommens ist sie bei Membrandefekten erhöht, obwohl keine Leberzellnekrosen vorhanden sein müssen [86]. Aus diesem Grund wurde bei unserem Versuch auf die Bestimmung dieses Enzyms verzichtet.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Systemische hämodynamische Parameter

Die Herzfrequenz steigt in beiden Gruppen in der Schockphase über 200 bpm an, was als Kompensationsmechanismus bei Hypovolämie erklärt werden kann. In der Reperusionsphase sinkt die Herzfrequenz in der INO-1001 Gruppe schneller ab und erreicht das Ausgangsniveau. Bei beiden Gruppen kann eine Hypovolämie bei normwertigem intrathorakalem Blutvolumen ($> 850 \text{ ml} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) als Ursache ausgeschlossen werden, muss der Unterschied in der Herzfrequenz eine andere Ursache haben. Z. B. kann eine unterschiedliche Sympathikussaktivierung vorliegen bzw. eine Modulation dieser durch INO-1001 stattgefunden haben. Andererseits kann auch die inflammatorische Antwort, insbesondere die Zytokinausschüttung nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion, von INO-1001 beeinflusst worden sein [70, 163]. Jedoch wäre bei einer stärkeren inflammatorischen Antwort in den Kontrolltieren ein niedrigerer systemischer Gefäßwiderstand und daher bei höherer Herzfrequenz ein höheres Herzzeitvolumen zu erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall, da der Herzzeitvolumenindex in beiden Gruppen um zweidrittel in der Schockphase reduziert ist, sich in der frühen Reperfusion (1 h) auf Ausgangsniveau erholt, aber nach 5 h Reperfusion in den Kontrolltieren um 30 % eingeschränkt bleibt. Die Herzfrequenzen in beiden Gruppen (142 vs. 112) liegen nahe der physiologischen Normwerte beim Schwein [57], so dass nicht von einer tachykarden Dekompensation ausgegangen werden kann.

Der mittlere arterielle Blutdruck ist in beiden Gruppen zu den einzelnen Messzeitpunkten vergleichbar. Dies widerspricht zusätzlich der These eines Widerstandsverlustes bei den Kontrolltieren. Des weiteren ist kein direkter kreislaufunterstützender, d. h. inotroper, vasokonstriktiver usw. Wirkmechanismus eines PARP-Inhibitors bekannt [109, 129]

4.2.2 Entnommene Blutmenge und Volumensubstitution

Die Blutmenge, die entnommen wurde, um den Ziel-MAP von 40 mmHg ist in beiden Versuchsgruppen vergleichbar. Sie entspricht rund 60 % des zirkulierenden Blutvolumens [157]. Die Mengen sind auch vergleichbar mit den Daten Schmittinger et al. im Model eines unkontrollierten hämorrhagischen Schocks [133]. Bei einem hämorrhagischen Schock-Versuch mit Hunden war dieser MAP gerade ausreichend, um die Tiere unbehandelt über 60 min am Leben zu halten [28]. Auch bei Traumapatienten konnten ähnliche Daten erhoben werden [141]. Dieser Blutverlust beim Schwein führt unbehandelt zum Tod.

Die Retransfusion entspricht dem Protokoll vieler Schockmodelle in der Literatur und auch dem Transfusionreglement im klinischen Alltag. Die Volumensubstitution erfolgte nach den aktuellen medizinischen Therapiestandards für den hämorrhagischen Schock [62] und wurde durch den Vorlastparameter ITBI gesteuert. Daneben zeigte die Auswertung der Hämoglobinkonzentration, dass bei unseren Versuchen keine Verdünnung des zirkulierenden Blutes stattfand.

4.2.3 Leberblutflüsse

Aufgrund der fehlenden Unterschiede in der Makrozirkulation der Leber scheint der PARP-Inhibitor INO-1001 keine vasoaktiven Effekte zu haben. Dies entspricht den Ergebnissen der Literatur [124, 129]. Während der Schockphase bei einem mittleren arteriellen Druck von 40 mmHg fällt auch der gesamtheptische Blutfluss auf ein Drittel des Ausgangswertes. In der Frühphase der Reperfusion, d. h. innerhalb der ersten Minuten der Reperusionsphase kommt es zu einer Erhöhung des gesamtheptischen Blutflusses in beiden Gruppen. Da zu diesem Zeitpunkt keine Daten erhoben wurden, sind die Ergebnisse bzw. Veränderungen auch nicht dargestellt. Dieser Effekt wird auch „rebound hyperemia“ genannt [140] und wird auf eine systemische entzündliche Reaktion nach einem Trauma/Schock zurück geführt

[60, 140]. Da dies in beiden Gruppen in ähnlicher Weise stattfand, ist auch nicht von einem direkten antiinflammatorischen Effekt des PARP-Inhibitors auszugehen.

Das Sauerstoffangebot der Leber ist während der Schockphase deutlich eingeschränkt und entspricht beinahe dem Sauerstoffbedarf, so dass von einer kritischen Sauerstoffversorgung dieses Organs ausgegangen werden muss. Eine Kompensation durch eine Steigerung des Blutflusses der A. hepatica im Sinne einer Autoregulation, des sog. „hepatic arterial buffer response“ [90], ist nicht zu beobachten. Dabei kommt es zu einer Adenosin-vermittelten Vasodilatation der Arterica hepatica bei vermindertem arteriellem Druck [90, 127]. Dies ist jedoch nicht weiter verwunderlich, da der Schock so rasch eintritt, dass Kompensationsmechanismen nicht zusammen eintreten [90]. Für die Portalvene ist kein eigener Autoregulationsmechanismus für Blutflussschwankung bekannt [37, 60, 125].

Nach der einstündigen Schockphase ist keine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs erkennbar, wie es beispielsweise bei Patienten nach Traumata oder mit thermischen Verletzungen zu beobachten ist [10, 173]. Auch übersteigt der Sauerstoffverbrauch der Leber nicht das Sauerstoffangebot wie Dunham et al. in einem Hundemodell zeigten [38].

4.2.4 Leberoberflächenoxygenierung

Der Gewebeoberflächensauerstoffpartialdruck der Leber lässt bis zum Ende der ersten Stunde der Reperfusion kein großer Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen. Im weiteren Verlauf der Reperfusion kommt es zu einem starken Abfall der Leberoberflächenoxygenierung bei den Kontrolltieren. Bei den INO-1001 behandelten Tieren entspricht die Leberoberflächenoxygenierung nach 5 h Reperfusion dem Ausgangswert.

Wie im Abschnitt 4.1.2.3 erwähnt, werden anscheinend die kapselnahen Bereiche der Leber stärker perfundiert als zentral gelegene Abschnitte. Da die Makrozirkulation der Leber jedoch nicht durch INO-1001 beeinflusst wird und in beiden Gruppen mit derselben Methode der Oberflächensauerstoffgehalt gemessen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Effekt auf den PARP-Inhibitor zurückzuführen ist. Aus der Literatur und aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die PARP-Inhibition bei Ischämie-Reperfusionszuständen Einfluss auf die Mikrozirkulation nehmen. Diese Effekte treten nicht in der Initialphase der

Reperfusion sondern erst im Verlauf auf. Eine Ursache für die niedrige Leberoberflächenoxygenierung bei den Kontrolltieren kann die durch PARP hochregulierten zellulären Interaktionsmoleküle (ICAM-1) sein. Cuzzocrea et al. zeigte, dass PARP-Inhibitoren die ICAM-1 Moleküle bei Entzündungsreaktionen in der Lunge verringern können [33]. Diese verursachen bei Ischämie/Reperfusion eine verstärkte Interaktion von Thrombozyten und Endothelzellen sowie Leukozyten und Endothelzellen [51, 81, 115]. Weiterhin findet bei der Reperfusion eine erhöhte Einwanderung von Monozyten statt [51, 164]. Diese Ergebnisse ließen sich in der Intravital-Fluorescence-Mikroskopie nachweisen. Dabei war eine Verschlechterung der Durchblutung in den Mikrogefäßen und den Lebersinusoiden zu beobachten. Liaudet et al. [94] beobachtet eine Verschlechterung der Mikrozirkulation in der intestinalen Mucosa nach Ischämie und Reperfusion. Szabo et al. [149] beschrieben dies am Myokard. Ursächlich für die eingeschränkte Mikrozirkulation in den reperfundierten Geweben war eine Einwanderung von Entzündungszellen, insbesondere neutrophile Granulozyten. Dies wurde auch an der Leber intravitalmikroskopisch durch Roesner et al. nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion an Ratten gezeigt. Dabei wurde neben einer erhöhten Leukozytenstase in den Lebersinusoiden eine starke Zunahme von adhärierenden Leukozyten in den postsinusoidalen Venolen beobachtet. Diese Leukozyten-Endothelinteraktionen wurden deutlich durch PARP-Inhibition verringert [114].

Ein weiterer Grund für die eingeschränkte Leberoberflächenoxygenierung der Kontrolltiere könnte der wie in der Einleitung (1.6) beschriebene durch PARP-Aktivierung gesteigerte Verbrauch an energiereichen Substanzen sein. Bei Ischämie-Reperfusionsphänomenen kommt es zur oxydativen DNS-Schäden, so dass es zur PARP-Aktivierung kommt. Mittlerweile wird aber auch eine direkte oxidative PARP-Aktivierung vermutet. PARP versucht DNS-Schäden zu reparieren, wodurch Energie in Form von ATP und NAD verbraucht wird. Im Falle einer zu großen Schädigung [36, 51, 164] ist PARP nicht in der Lage diese zu reparieren, so dass es zu frustranen Reparaturphänomenen kommt. Dabei erleidet die Zelle einen Energiemangel, was mit einer eingeschränkten Oxygenierung einhergeht. Dies konnte bei Rattenlebern durch Messung der Gewebhypoxie mittels NAD-Autofluoreszenz gezeigt werden. Eine PARP-Inhibition reduziert das Ausmaß der Gewebhypoxie deutlich [114].

4.2.5 Leberenzymaktivität

Die in diesem Versuch untersuchte Aspartat-Aminotransferase (AST), dient als Marker für die Schädigung der Hepatozyten. Nach dem hämorrhagischen Schock und fünf-stündiger Reperfusion stiegen die AST-Werte in der Kontrollgruppe an. Die mehr als zwei-einhalb-fache Erhöhung des AST-Wertes ist nur zu erklären durch den Untergang von Leberparenchym, der durch den in der Einleitung (1.6) beschriebenen oxidativen Schaden hervorgerufen wird. Durch die Ischämie und der anschließenden Reperfusion bildeten sich freie Radikale, die u. a. die DNS der Hepatozyten schädigten. Eine starke PARP-Aktivierung führte zur zellulären Energiedepletion und damit zum Untergang der Zellen [36, 51, 164]. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem Versuch von Thiernemann & Bowes [17]. Diese untersuchten mehrere PARP-Inhibitoren auf deren Wirkung auf die Leber und fanden bei keinen der eingesetzten Stoffe eine Veränderung zu der Kontrollgruppe. Jedoch wurde in dieser Studie kein INO-1001 verwendet und die Untersuchungen fanden an Ratten und Kaninchen statt. Dieselbe Gruppe zeigte in einer späteren Arbeit, dass eine PARP-Inhibition den Leberschaden nach Ischämie und Reperfusion senkt. Als Surogatparameter wurden die AST, die Laktat-Dehydrogenase und die Gamma-Glutamyl-Transferase verwendet [115]. Dieses Ergebnis wurde durch Khandoga et al. bestätigt [81].

Als Folge einer verbesserten Leberoxygenierung, eines verbesserten Energiehaushaltes und einer Reduktion der Leukozyten-Endothelinteraktionen konnten Roesner et al. eine verbesserte exkretorische Funktion der Leber, gemessen an der Galleproduktion, nachweisen.

4.2.6 Laktatkonzentration

Bei Hypoxie wird die Atmungskette gehemmt und es kommt zur anaeroben Glykolyse. Laktat sammelt sich als Endprodukt an. Die Leber hat die Aufgabe das anfallende Laktat mittels der Laktat-Dehydrogenase wieder zu Pyruvat zu oxidieren und im weiteren Ablauf zu Glukose umzuwandeln.

Bei dem durchgeführten Versuch ist in beiden Gruppen im Status des Schockes ein Anstieg der Laktatkonzentration im Plasma festzustellen. Dieser bleibt auch nach einer einstündigen Reperfusion noch auf einem drei-fach erhöhten Wert im Vergleich zum Ausgangswert.

Ähnlich wie die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Szabo et al. [148] bestehen zwischen der PARP-Inhibitor-Gruppe und den Kontrollen keine Unterschiede. Nach fünf Stunden Reperfusion fällt das Laktat wieder auf das Ausgangsniveau.

In der Literatur sind sehr unterschiedliche Angaben zum Laktatwert im Bezug auf PARP-Inhibitoren zu finden. So beschreiben Watts et al. 2001 [169] bei einem Rattenversuch eine Verringerung der Laktatkonzentration bei der Gabe von 3-Aminobenzamid vor der Reperfusion. Auch Ivanyi et al. [71] zeigt, dass sich durch den PARP-Inhibitor PJ34 am Darm ein geringerer Anstieg der Laktatkonzentration entwickelt und das Verhältnis von Laktat-Pyruvat in der Pfortader verringert. Jedoch ist kein Effekt auf den Lebermetabolismus beschrieben. In einer anderen Publikation aus dem Jahr 1998 weißt Wray et al. [175] darauf hin, dass die von der Arbeitsgruppe verwendeten Inhibitoren alle keine Auswirkung auf die Laktatkonzentration hatten, was 2001 von Theisen et al. bestätigt wurde [151].

4.2.7 Histologie

Im histologischen Ausschnitt der Leber ist die Verhinderung der PARP-Aktivität in den Hepatozyten zu erkennen. In einer Arbeit von Zingarelli sind solche Ergebnisse am Myokard beschrieben worden [179].

In den histologischen Präparaten der Leber zeigt sich eine Erhöhung der PARP-positiven Zellen in den Kontrolltieren. Dies konnte durch den PARP Inhibitor deutlich gesenkt aber nicht komplett verhindert werden. Eine Unterdosierung von INO-1001 mag die Ursache sein, wobei die verwendete Dosierung der empfohlenen Dosierung aus der Literatur entspricht [103, 128].

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des PARP-Inhibitors, INO-1001 auf den Leberschaden beim hämorrhagischen Schock im akut instrumentierten Schweinmodell untersucht. Der Inhibitor befindet sich in der klinischen Erprobung für die Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, in denen Ischämie-Reperusionsphänomene auftreten.

Es wurden zwei Gruppen mit je 7 Tieren untersucht. Alle Tiere wurden einem schweren hämorrhagischen Schock durch kontrolliertes Ausbluten bis auf einen arteriellen Mitteldruck von 40 mmHg für eine Stunde unterzogen. Das entnommene Blut wurde nach der Schockphase retransfundierte. Die eine Gruppe diente als Kontrollgruppe, die andere wurde mit INO-1001 vor der Reperfusion behandelt.

Der PARP-Inhibitor INO-1001 reduzierte deutlich die PARP-Aktivität in der Leber. INO-1001 hatte keinen Einfluss auf die systemische Makrozirkulation oder Lebermakrozirkulation.

Die PARP-Inhibition reduzierten die AST-Freisetzung nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion. Besonders eindrücklich war die deutlich weniger eingeschränkte Leberoberflächenoxygenierung. Die beobachteten protektiven Effekte können mit Ergebnissen von mikrozirkulatorischen Untersuchungen erklärt werden. Dabei wurden eine Reduktion der Leukozyten-Endothelinteraktion, eine verringerte Gewebehypoxie und ein verbesserter Energiehaushalt nachgewiesen.

Um den protektiven Einfluss auf die Leber nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion besser beurteilen zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen insbesondere im Langzeitversuch.

6 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1-1 Stadieneinteilung des Hämorrhagischen Schocks Committee on Trauma (2004) [157]</i>	6
<i>Abb. 1-2 Circulus vitiosus des hypovolämischen, hämorrhagischen Schocks [152]</i>	7
<i>Abb. 1-3 Inflammatorische Wege des hepatozellulären HS/R-Schadens [93]</i>	8
<i>Abb. 1-4 Pathophysiologie der Mikrozirkulationsstörung</i>	9
<i>Abb. 1-5 Initialmechanismus des Ischämie-Reperfusionsschadens [152]</i>	10
<i>Abb. 1-6 Circulus vitiosus der Radikalentstehung und PARP-Aktivierung von Gerö und Szabó [51]</i>	11
<i>Abb. 1-7 Bildung von NO, Superoxid und Peroxynitrit von Gerö und Szabó [51]</i>	12
<i>Abb. 1-8 Mikroskopischer Aufbau der Leber</i>	14
<i>Abb. 1-9 Lebersinusoid</i>	15
<i>Abb. 1-10 Blutversorgung der Leber</i>	16
<i>Abb. 2-1 Halspräparation</i>	24
<i>Abb. 2-2 Abdomen eröffnet</i>	25
<i>Abb. 2-3 Abdomen nach Katheteranlage</i>	26
<i>Abb. 2-4 Abdomen nach Präparation</i>	26
<i>Abb. 2-5 Arbeitsplatz mit der Mehrdrahtoberflächenelektrode</i>	29
<i>Abb. 2-6 Studienprotokoll (HS/ INO)</i>	31
<i>Diagramm 3-1: Herzfrequenz</i>	33
<i>Diagramm 3-2: Herzindex</i>	35
<i>Diagramm 3-3 Intrathorakaler Blutvolumenindex</i>	36
<i>Diagramm 3-4: Blutfluss in der Arteria hepatica</i>	38
<i>Diagramm 3-5: Blutfluss in der Vena portae</i>	39
<i>Diagramm 3-6: gesamter Leberblutfluss</i>	40
<i>Diagramm 3-7: gesamtes Lebersauerstoffangebot</i>	42
<i>Diagramm 3-8: Sauerstoffverbrauch der Leber</i>	43
<i>Diagramm 3-9: Leberoberflächenoxygenierung</i>	44
<i>Diagramm 3-10: Aspartat-Aminotransferase Konzentration</i>	45
<i>Diagramm 3-11: Histologische Auswertung</i>	48

7 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptose-Inducing-Factor
AIQ	Aminoisoquinolinon
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
AP1	activator protein 1
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATLS	advanced trauma life support
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Base Excision Repair Complex
Ca ²⁺	Calziumion
COLD	Cardic Output, Oxygenation, Lung water/Liver function, Diagnosis
DIQ	Dihydroxyisoquinolinon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNS-PK	DNS abhängige Proteinkinase
DO ₂ total hep	gesamtheptatisches Sauerstoffangebot
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase
HI	Herzzeitvolumenindex
HS	Hämorrhagischer Schock
HZV	Herzzeitvolumen
ICAM	intercellular adhesionmolecule 1
ICG	Indocyaningrün
IL	Interleukin
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
INO-1001	Isoindolinon-Derivat
ITBVI	Intrathorakaler Blutvolumenindex
ITBV	Intrathorakales Blutvolumen
K	Kalium
kDa	kilo Dalton
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
Na	Natrium
NaCl	Natrium-Chlorid
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH+H ⁺	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NF-κB	nuclearfactor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
paCO ₂	arterieller Kohlendioxid-Partialdruck
paO ₂	arterieller Sauerstoff-Partialdruck
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PDR _{ICG}	Indocyaningrün-Clearance
PEEP	Positiver Endexpiratorischer Druck
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

PiCCO	Pulse Contour Cardiac Output
PJ-34	Phenanthridion-Derivat
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
t	Zeit
t _{1/2}	Halbzeit
TNF- α	Tissue Necrose Factor-alpha
TnT	Troponin T
VO _{2 hep}	hepatischer Sauerstoffverbrauch
VPARP	Vault Poly (ADP-Ribose) Polymerase
XRCC1	X-ray repair complementing 1
ZVK	Zentralvenöser Katheter

8 Literaturverzeichnis

1. Ahlgren, I., K.F. Aronsen, I. Bjorkman, and S. Wetterlin, *Hemodynamics during superficial thiopental anesthesia in the dog*. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 1978. 22(1): p. 76-82.
2. Ahn, H., L.E. Ivarsson, K. Johansson, J. Lindhagen, and O. Lundgren, *Assessment of gastric blood flow with laser Doppler flowmetry*. Scand J Gastroenterol, 1988. 23(10): p. 1203-1210.
3. Anderson, N., *Gastrointestinal diseases and diarrhea in neonates*. Dodds WJ: The pig model for biochemical research., 1982. Fed Proc 41: p. 247-256.
4. Aneman, A., G. Eisenhofer, L. Fandriks, L. Olbe, J. Dalenback, P. Nitescu, and P. Friberg, *Splanchnic circulation and regional sympathetic outflow during peroperative PEEP ventilation in humans*. British Journal of Anaesthesia, 1999. 82(6): p. 838-842.
5. Arii, S., K. Teramoto, and T. Kawamura, *Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2003. 10(3): p. 189-194.
6. Arroyo, C.M., J.H. Kramer, B.F. Dickens, and W.B. Weglicki, *Identification of free radicals in myocardial ischemia/reperfusion by spin trapping with nitron DMPO*. FEBS Lett, 1987. 221(1): p. 101-104.
7. Arroyo, C.M., J.H. Kramer, R.H. Leiboff, G.W. Mergner, B.F. Dickens, and W.B. Weglicki, *Spin trapping of oxygen and carbon-centered free radicals in ischemic canine myocardium*. Free Radic Biol Med, 1987. 3(5): p. 313-316.
8. Arvidsson, D., H. Svensson, and U. Haglund, *Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow*. American Journal of Physiology, 1988. 254(4 Pt 1): p. G471-476.
9. Augustin, A., C. Spenlehauer, H. Dumond, J. Menissier-De Murcia, M. Piel, A.C. Schmit, F. Apiou, J.L. Vonesch, M. Kock, M. Bornens, and G. De Murcia, *PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression*. Journal of Cell Science, 2003. 116(Pt 8): p. 1551-1562.
10. Aulick, L.H., C.W. Goodwin, Jr., R.A. Becker, and D.W. Wilmore, *Visceral blood flow following thermal injury*. Ann Surg, 1981. 193(1): p. 112-116.
11. Bachmann, S., J.C. Caldwell-Kenkel, R.T. Currin, S.N. Lichtman, R. Steffen, R.G. Thurman, and J.J. Lemasters, *Protection by pentoxifylline against graft failure from storage injury after orthotopic rat liver transplantation with arterialization*. Transpl Int, 1992. 5 Suppl 1: p. S345-350.
12. Becker, M. and R. Beglinger, *Beitrag zur Versuchsanordnung fur die Untersuchung von Narkosemitteln beim Gottinger Miniaturschwein*. Anaesthesist, 1979. 28(7): p. 334-338.
13. Bedran de Castro, M.T., H.F. Downey, G.J. Crystal, and F.A. Bashour, *Effect of controlled ventilation on renal and splanchnic blood flows during nicotine*. American Journal of Physiology, 1985. 248(3 Pt 2): p. H360-365.
14. Beglinger, R., M. Becker, E. Eggenberger, and C. Lombard, *Das Gottinger Miniaturschwein als Versuchstier. 1. Mitteilung: Literaturubersicht, Zucht und Haltung, Kreislaufparameter*. Research in Experimental Medicine, 1975. 165(3): p. 251-263.
15. Blum, H., *Rat liver metabolism in hemorrhagic traumatic shock*. Circulatory Shock, 1989. 29(4): p. 291-300.
16. Bohrer, S.L., E.L. Rogers, R.C. Koehler, and R.J. Traystman, *Effect of hypovolemic hypotension and laparotomy on splanchnic and hepatic arterial blood flow in dogs*. Current Surgery, 1981. 38(5): p. 325-328.
17. Bowes, J. and C. Thiernemann, *Effects of inhibitors of the activity of poly (ADP-ribose) synthetase on the liver injury caused by ischaemia-reperfusion: a comparison with radical scavengers*. British Journal of Pharmacology, 1998. 124(6): p. 1254-1260.
18. Brass, C.A., J. Narciso, and J.L. Gollan, *Enhanced activity of the free radical producing enzyme xanthine oxidase in hypoxic rat liver. Regulation and pathophysiologic significance*. J Clin Invest, 1991. 87(2): p. 424-431.

19. Bredenberg, C.E., A. Paskanik, and D. Fromm, *Portal hemodynamics in dogs during mechanical ventilation with positive end-expiratory pressure*. Surgery, 1981. 90(5): p. 817-822.
20. Bredenberg, C.E. and A.M. Paskanik, *Relation of portal hemodynamics to cardiac output during mechanical ventilation with PEEP*. Annals of Surgery, 1983. 198(2): p. 218-222.
21. Bremer, C., B.U. Bradford, K.J. Hunt, K.T. Knecht, H.D. Connor, R.P. Mason, and R.G. Thurman, *Role of Kupffer cells in the pathogenesis of hepatic reperfusion injury*. Am J Physiol, 1994. 267(4 Pt 1): p. G630-636.
22. Brienza, N., J.P. Revely, T. Ayuse, and J.L. Robotham, *Effects of PEEP on liver arterial and venous blood flows*. American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine, 1995. 152(2): p. 504-510.
23. Bryant, H.E. and T. Helleday, *Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors as potential chemotherapeutic agents*. Biochem Soc Trans, 2004. 32(Pt 6): p. 959-961.
24. Buki, K.G., P.I. Bauer, A. Hakam, and E. Kun, *Identification of domains of poly(ADP-ribose) polymerase for protein binding and self-association*. Journal of Biological Chemistry, 1995. 270(7): p. 3370-3377.
25. Bulkley, G.B., *The role of oxygen free radicals in human disease processes*. Surgery, 1983. 94(3): p. 407-411.
26. Caldwell-Kenkel, J.C., R.T. Currin, Y. Tanaka, R.G. Thurman, and J.J. Lemasters, *Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers*. Hepatology, 1989. 10(3): p. 292-299.
27. Caldwell-Kenkel, J.C., R.G. Thurman, and J.J. Lemasters, *Selective loss of nonparenchymal cell viability after cold ischemic storage of rat livers*. Transplantation, 1988. 45(4): p. 834-837.
28. Capone, A., *Complete Recovery after Normothermic Hemorrhagic Shock and Profound Hypothermic Circulatory Arrest of 60 Minutes in Dogs*. The Journal of trauma, 1996. 40(3): p. 388.
29. Chen, T., R. Zamora, B. Zuckerbraun, and T.R. Billiar, *Role of nitric oxide in liver injury*. Curr Mol Med, 2003. 3(6): p. 519-526.
30. Clavien, P.A., P.R. Harvey, and S.M. Strasberg, *Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies*. Transplantation, 1992. 53(5): p. 957-978.
31. Clavien, P.A., G.R. Morgan, J.R. Sanabria, C. Petrunka, G.A. Levy, P. Robert, C. Harvey, and S.M. Strasberg, *Effect of cold preservation on lymphocyte adherence in the perfused rat liver*. Transplantation, 1991. 52(3): p. 412-417.
32. Conzen, P.F., J. Hobbhahn, A.E. Goetz, H. Habazettl, T. Granetzny, K. Peter, and W. Brendel, *Splanchnic oxygen consumption and hepatic surface oxygen tensions during isoflurane anesthesia*. Anesthesiology, 1988. 69(5): p. 643-651.
33. Cuzzocrea, S., *Shock, inflammation and PARP*. Pharmacological Research, 2005. 52(1): p. 72-82.
34. DePalma, R.G., W.D. Holden, and A.V. Robinson, *Fluid therapy in experimental hemorrhagic shock: ultrastructural effects in liver and muscle*. Annals of Surgery, 1972. 175(4): p. 539-551.
35. Dhasmana, K.M., P.R. Saxena, O. Prakash, and H.T. Van der Zee, *A study on the influence of ketamine on systemic and regional haemodynamics in conscious rabbits*. Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie, 1984. 269(2): p. 323-334.
36. Diefenbach, J. and A. Burkle, *Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism*. Cellular & Molecular Life Sciences, 2005. 62(7-8): p. 721-730.
37. Drapanas, T., R. Zemel, and J.O. Vang, *Hemodynamics of the isolated perfused pig liver: metabolism according to routes of perfusion and rates of flow*. Ann Surg, 1966. 164(3): p. 522-537.
38. Dunham, C.M., M. Fabian, J.H. Siegel, and L. Gettings, *Hepatic insufficiency and increased proteolysis, cardiac output, and oxygen consumption following hemorrhage*. Circ Shock, 1991. 35(2): p. 78-86.
39. Fegler, G., *Measurement of cardiac output in anaesthetized animals by a thermodilution method*. Quarterly Journal of Experimental Physiology & Cognate Medical Sciences, 1954. 39(3): p. 153-164.

40. Flacke, J.W., W.E. Flacke, B.C. Bloor, and S. Olewine, *Effects of fentanyl, naloxone, and clonidine on hemodynamics and plasma catecholamine levels in dogs*. *Anesthesia & Analgesia*, 1983. 62(3): p. 305-313.
41. Frank, K.H., M. Kessler, K. Appelbaum, and W. Dummmler, *The Erlangen micro-lightguide spectrophotometer EMPHO I*. *Phys Med Biol*, 1989. 34(12): p. 1883-1900.
42. Friedl, H.P., G.O. Till, U.S. Ryan, and P.A. Ward, *Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells*. *Faseb J*, 1989. 3(13): p. 2512-2518.
43. Fujita, Y., *Effects of PEEP on splanchnic hemodynamics and blood volume*. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 1993. 37(4): p. 427-431.
44. Fujita, Y., T. Sakai, A. Ohsumi, and M. Takaori, *Effects of hypocapnia and hypercapnia on splanchnic circulation and hepatic function in the beagle*. *Anesthesia & Analgesia*, 1989. 69(2): p. 152-157.
45. Ganz, W. and H.J. Swan, *Measurement of blood flow by thermodilution*. *American Journal of Cardiology*, 1972. 29(2): p. 241-246.
46. Gao, W., R.C. Bentley, J.F. Madden, and P.A. Clavien, *Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation*. *Hepatology*, 1998. 27(6): p. 1652-1660.
47. Gao, W.S., Y. Takei, I. Marzi, K.A. Lindert, J.C. Caldwell-Kenkel, R.T. Currin, Y. Tanaka, J.J. Lemasters, and R.G. Thurman, *Carolina rinse solution--a new strategy to increase survival time after orthotopic liver transplantation in the rat*. *Transplantation*, 1991. 52(3): p. 417-424.
48. Gelman, S., *General anesthesia and hepatic circulation*. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology*, 1987. 65(8): p. 1762-1779.
49. Gelman, S., K.C. Fowler, S.P. Bishop, and L.R. Smith, *Cardiac output distribution and regional blood flow during hypocarbia in monkeys*. *Journal of Applied Physiology*, 1985. 58(4): p. 1225-1230.
50. Gelman, S.I., *Disturbances in hepatic blood flow during anesthesia and surgery*. *Archives of Surgery*, 1976. 111(8): p. 881-883.
51. Gero, D. and C. Szabo, *Role of the peroxynitrite-poly (ADP-ribose) polymerase pathway in the pathogenesis of liver injury*. *Curr Pharm Des*, 2006. 12(23): p. 2903-2910.
52. Gilmour, D.G., I.H. Douglas, A.R. Aitkenhead, A.P. Hotherhall, P.W. Horton, and I.M. Ledingham, *Colon blood flow in the dog: effects of changes in arterial carbon dioxide tension*. *Cardiovascular Research*, 1980. 14(1): p. 11-20.
53. Gouma, D.J., J.C. Coelho, J. Schlegel, J.D. Fisher, Y.F. Li, and F.G. Moody, *Estimation of hepatic blood flow by hydrogen gas clearance*. *Surgery*, 1986. 99(4): p. 439-445.
54. Granger, D.N., P.D. Richardson, P.R. Kvietys, and N.A. Mortillaro, *Intestinal blood flow*. *Gastroenterology*, 1980. 78(4): p. 837-863.
55. Greenway, C.V. and G. Oshiro, *Intrahepatic distribution of portal and hepatic arterial blood flows in anaesthetized cats and dogs and the effects of portal occlusion, raised venous pressure and histamine*. *Journal of Physiology*, 1972. 227(2): p. 473-485.
56. Halestrap, A.P., *Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die*. *Biochem Soc Trans*, 2006. 34(Pt 2): p. 232-237.
57. Hannon, J.P., C.A. Bossone, and C.E. Wade, *Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research*. *Lab Anim Sci*, 1990. 40(3): p. 293-298.
58. Hassa, P.O. and M.O. Hottiger, *The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders*. *Cell Mol Life Sci*, 2002. 59(9): p. 1534-1553.
59. Heimisch, W.E., *Blutflussmessung in der Herz-und Gefaesshirurgie: Methodik-Technik-Praxis*. *Gefässchirurgie*, 1997: p. 195.
60. Helling, T.S., *The liver and hemorrhagic shock*. *Journal of the American College of Surgeons*, 2005. 201(5): p. 774-783.
61. Hernandez, L.A., M.B. Grisham, B. Twohig, K.E. Arfors, J.M. Harlan, and D.N. Granger, *Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury*. *Am J Physiol*, 1987. 253(3 Pt 2): p. H699-703.
62. Herold, G., *Innere Medizin*. Schock. 2005, Köln: Herold. 268-273.

63. Housset, C., D.C. Rockey, and D.M. Bissell, *Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(20): p. 9266-9270.
64. Hughes, R.L., R.T. Mathie, D. Campbell, and W. Fitch, *Effect of hypercarbia on hepatic blood flow and oxygen consumption in the greyhound*. British Journal of Anaesthesia, 1979. 51(4): p. 289-296.
65. Hughes, R.L., R.T. Mathie, D. Campbell, and W. Fitch, *Systemic hypoxia and hyperoxia, and liver blood flow and oxygen consumption in the greyhound*. Pflugers Archiv - European Journal of Physiology, 1979. 381(2): p. 151-157.
66. Hughes, R.L., R.T. Mathie, W. Fitch, and D. Campbell, *Liver blood flow and oxygen consumption during hypocapnia and IPPV in the greyhound*. Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental & Exercise Physiology, 1979. 47(2): p. 290-295.
67. Iber, T., C. Mutz, D. Vagts, J. Roesner, V. Kurzweg, M. Hebig, and G. Noeldge-Schomburg, *Intrathoracic blood volume (ITBV)-guided volume therapy maintains intestinal perfusion and oxygenation despite positive end expiratory pressure (PEEP) ventilation*. Critical Care, 2004. 8(Suppl 1): p. P60.
68. Idvall, J., I. Ahlgren, K.R. Aronsen, and P. Stenberg, *Ketamine infusions: pharmacokinetics and clinical effects*. British Journal of Anaesthesia, 1979. 51(12): p. 1167-1173.
69. Ikejima, M., S. Noguchi, R. Yamashita, T. Ogura, T. Sugimura, D.M. Gill, and M. Miwa, *The zinc fingers of human poly(ADP-ribose) polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and nicks and the consequent enzyme activation. Other structures recognize intact DNA*. Journal of Biological Chemistry, 1990. 265(35): p. 21907-21913.
70. Inotek, *INO-1001: Poly (ADP ribose) Polymerase Inhibitor*. 2006, Inotek Pharmaceuticals Corporation.
71. Ivanyi, Z., B. Hauser, A. Pittner, P. Asfar, D. Vassilev, M. Nalos, J. Altherr, U.B. Bruckner, C. Szabo, P. Radermacher, and G. Froba, *Systemic and hepatosplanchnic hemodynamic and metabolic effects of the PARP inhibitor PJ34 during hyperdynamic porcine endotoxemia*. Shock, 2003. 19(5): p. 415-421.
72. Jaeschke, H., A.P. Bautista, Z. Spolarics, and J.J. Spitzer, *Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia*. Free Radic Res Commun, 1991. 15(5): p. 277-284.
73. Jaeschke, H., A.P. Bautista, Z. Spolarics, and J.J. Spitzer, *Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats*. J Leukoc Biol, 1992. 52(4): p. 377-382.
74. Jaeschke, H. and A. Farhood, *Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver*. Am J Physiol, 1991. 260(3 Pt 1): p. G355-362.
75. Kamerling, S.G., D.J. DeQuick, T.J. Weckman, and T. Tobin, *Dose-related effects of fentanyl on autonomic and behavioral responses in performance horses*. General Pharmacology, 1985. 16(3): p. 253-258.
76. Kessler, M., *Normale und kritische Sauerstoffversorgung der Leber bei Normo- und Hypothermie : mit 7 Tab. / vorgelegt von Manfred Kessler*. 1967.
77. Kessler, M., J. Hoper, D.K. Harrison, K. Skolasinska, W.P. Klovekorn, F. Sebening, H.J. Volkholz, I. Beier, C. Kernbach, and V. Rettig, *Tissue O₂ supply under normal and pathological conditions*. Advances in Experimental Medicine & Biology, 1984. 169: p. 69-80.
78. Kessler, M., J. Hoper, and B.A. Krumme, *Monitoring of tissue perfusion and cellular function*. Anesthesiology, 1976. 45(2): p. 184-197.
79. Kessler, M. and D.W. Luebbe, *Oxygen transport in blood and tissue*. 1967, Stuttgart: Thieme. 10.
80. Kessler, M.S., *Ion and enzyme electrodes in biology and medicine*. Alteration in rat liver cells and tissue by needle electrodes, ed. Schäfer, D.H., J. 1976. 217 - 222.
81. Khandoga, A., P. Biberthaler, G. Enders, and F. Krombach, *5-Aminoisoquinolinone, a novel inhibitor of poly(adenosine disphosphate-ribose) polymerase, reduces microvascular liver injury but not mortality rate after hepatic ischemia-reperfusion.[see comment]*. Critical Care Medicine, 2004. 32(2): p. 472-477.

82. Kim, J.S., L. He, and J.J. Lemasters, *Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 304(3): p. 463-470.
83. Koehler, R.C., R.J. Traystman, and M.D. Jones, Jr., *Regional blood flow and O₂ transport during hypoxic and CO hypoxia in neonatal and adult sheep*. American Journal of Physiology, 1985. 248(1 Pt 2): p. H118-124.
84. Komatsu, H., A. Koo, and P.H. Guth, *Leukocyte flow dynamics in the rat liver microcirculation*. Microvascular Research, 1990. 40(1): p. 1-13.
85. Koo, A. and I.Y. Liang, *Blood flow in hepatic sinusoids in experimental hemorrhagic shock in the rat*. Microvascular Research, 1977. 13(3): p. 315-325.
86. Kraft, W. and U.M. Duerr, *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. 1997, Stuttgart: Schattauer.
87. Kramer, J.H., C.M. Arroyo, B.F. Dickens, and W.B. Weglicki, *Spin-trapping evidence that graded myocardial ischemia alters post-ischemic superoxide production*. Free Radic Biol Med, 1987. 3(2): p. 153-159.
88. Krenn, C.G., P. Krafft, B. Schaefer, H. Pokorny, B. Schneider, M.R. Pinsky, and H. Steltzer, *Effects of positive end-expiratory pressure on hemodynamics and indocyanine green kinetics in patients after orthotopic liver transplantation*. Critical Care Medicine, 2000. 28(6): p. 1760-1765.
89. Kuchenreuther, S., J. Adler, W. Schutz, O. Eichelbronner, and M. Georgieff, *The Erlanger Microlightguide Photometer: a new concept for monitoring intracapillary oxygen supply of tissue--first results and a review of the physiological basis*. J Clin Monit, 1996. 12(3): p. 211-224.
90. Lautt, W.W., D.J. Legare, and M.S. d'Almeida, *Adenosine as putative regulator of hepatic arterial flow (the buffer response)*. Am J Physiol, 1985. 248(3 Pt 2): p. H331-338.
91. Lautt, W.W. and M.P. Macedo, *Hepatic circulation and toxicology*. Drug Metabolism Reviews, 1997. 29(1-2): p. 369-395.
92. Lehmann, T., *Die Bedeutung der toxischen Sauerstoffradikale beim Ischämie/Reperfusionsschaden nach Lebertransplantation in der Ratte - protektive Therapie durch adenoviralen Gentransfer von Superoxiddismutase*, in *Chirurgie*. 2004, Humboldt-Universität Berlin, Campus Virchow Klinikum, Charité: Berlin.
93. Lentsch, A.B., A. Kato, H. Yoshidome, K.M. McMasters, and M.J. Edwards, *Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury*. Hepatology, 2000. 32(2): p. 169-173.
94. Liaudet, L., A. Szabo, F.G. Soriano, B. Zingarelli, C. Szabo, and A.L. Salzman, *Poly (ADP-ribose) synthetase mediates intestinal mucosal barrier dysfunction after mesenteric ischemia*. Shock, 2000. 14(2): p. 134-141.
95. Lubbers, D.W., *Methods of measuring oxygen tensions of blood and organ surfaces*. International anesthesiology clinics, 1966. 4(1): p. 103-127.
96. Lubbers, D.W., *[The significance of the local oxygen pressure and of the PO₂ histogram for the evaluation of the state of oxygen supply to various organs (author's transl)]*. Prakt Anaesth, 1977. 12(3): p. 184-193.
97. Lund, N., L. Jorfeldt, and D.H. Lewis, *Skeletal muscle oxygen pressure fields in healthy human volunteers. A study of the normal state and the effects of different arterial oxygen pressures*. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 1980. 24(4): p. 272-278.
98. Lunde, O.C., K. Kvernebo, and S. Larsen, *Evaluation of endoscopic laser Doppler flowmetry for measurement of human gastric blood flow. Methodologic aspects*. Scand J Gastroenterol, 1988. 23(9): p. 1072-1078.
99. Machens, H.G., N. Pallua, P. Mailaender, J. Pasel, K.H. Frank, R. Reimer, and A. Berger, *Measurements of tissue blood flow by the hydrogen clearance technique (HCT): a comparative study including laser Doppler flowmetry (LDF) and the Erlangen micro-lightguide spectrophotometer (EMPHO)*. Microsurgery, 1995. 16(12): p. 808-817.
100. Makisalo, H.J., H.O. Soini, M.L. Tapani Lalla, and K.A. Hockerstedt, *Subcutaneous and liver tissue oxygen tension in hemorrhagic shock: an experimental study with whole blood and two colloids*. Critical Care Medicine, 1988. 16(9): p. 857-861.

101. Marzi, I., J. Knee, M.D. Menger, G. Harbauer, and V. Buhren, *Hepatic microcirculatory disturbances due to portal vein clamping in the orthotopic rat liver transplantation model*. Transplantation, 1991. 52(3): p. 432-436.
102. Marzi, I., Z. Zhong, J.J. Lemasters, and R.G. Thurman, *Evidence that graft survival is not related to parenchymal cell viability in rat liver transplantation. The importance of nonparenchymal cells*. Transplantation, 1989. 48(3): p. 463-468.
103. Mason, K.A., D. Valdecanas, N.R. Hunter, and L. Milas, *INO-1001, a novel inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, enhances tumor response to doxorubicin*. Invest New Drugs, 2008. 26(1): p. 1-5.
104. Mathie, R.T. and L.H. Blumgart, *Effect of denervation on the hepatic haemodynamic response to hypercapnia and hypoxia in the dog*. Pflugers Archiv - European Journal of Physiology, 1983. 397(2): p. 152-157.
105. Matuschak, G.M., M.R. Pinsky, and R.M. Rogers, *Effects of positive end-expiratory pressure on hepatic blood flow and performance*. Journal of Applied Physiology, 1987. 62(4): p. 1377-1383.
106. Mazen, A., J. Menissier-de Murcia, M. Molinete, F. Simonin, G. Gradwohl, G. Poirier, and G. de Murcia, *Poly(ADP-ribose)polymerase: a novel finger protein*. Nucleic Acids Research, 1989. 17(12): p. 4689-4698.
107. McCord, J.M., *Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury*. N Engl J Med, 1985. 312(3): p. 159-163.
108. McCord, J.M., *Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation*. Fed Proc, 1987. 46(7): p. 2402-2406.
109. McDonald, M.C., H. Mota-Filipe, J.A. Wright, M. Abdelrahman, M.D. Threadgill, A.S. Thompson, and C. Thiernemann, *Effects of 5-aminoisoquinolinone, a water-soluble, potent inhibitor of the activity of poly (ADP-ribose) polymerase on the organ injury and dysfunction caused by haemorrhagic shock*. Br J Pharmacol, 2000. 130(4): p. 843-850.
110. McKeown, C.M., V. Edwards, M.J. Phillips, P.R. Harvey, C.N. Petrunka, and S.M. Strasberg, *Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat*. Transplantation, 1988. 46(2): p. 178-191.
111. Menissier de Murcia, J., M. Ricoul, L. Tartier, C. Niedergang, A. Huber, F. Dantzer, V. Schreiber, J.C. Ame, A. Dierich, M. LeMeur, L. Sabatier, P. Chambon, and G. de Murcia, *Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse*. EMBO Journal, 2003. 22(9): p. 2255-2263.
112. Messmer, K., *[Rheologic principles of shock therapy]*. Internist (Berl), 1982. 23(8): p. 445-449.
113. Messmer, K., K. Wanner, H.J. Reulen, and K.J. Nordmann, *Initiale Durchblutungsreaktionen abdomineller Organe im Endotoxinschock*. Langenbecks Archiv für Chirurgie, 1966. 316: p. 659-664.
114. Mori, E., M. Hasebe, K. Kobayashi, and N. Iijima, *Alterations in metabolite levels in carbohydrate and energy metabolism of rat in hemorrhagic shock and sepsis*. Metabolism: Clinical & Experimental, 1987. 36(1): p. 14-20.
115. Mota-Filipe, H., B. Sepodes, M.C. McDonald, S. Cuzzocrea, R. Pinto, and C. Thiernemann, *The novel PARP inhibitor 5-aminoisoquinolinone reduces the liver injury caused by ischemia and reperfusion in the rat*. Medical Science Monitor, 2002. 8(11): p. BR444-453.
116. Nagano, K., S. Gelman, E.L. Bradley, Jr., and D. Parks, *Hypothermia, hepatic oxygen supply-demand, and ischemia-reperfusion injury in pigs*. American Journal of Physiology, 1990. 258(6 Pt 1): p. G910-918.
117. Oliver, F.J., J. Menissier-de Murcia, C. Nacci, P. Decker, R. Andriantsitohaina, S. Muller, G. de la Rubia, J.C. Stoclet, and G. de Murcia, *Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice*. EMBO J, 1999. 18(16): p. 4446-4454.
118. Pacher, P. and C. Szabo, *Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors*. Cardiovasc Drug Rev, 2007. 25(3): p. 235-260.
119. Pannen, B.H., S. Schroll, T. Loop, M. Bauer, A. Hoetzel, and K.K. Geiger, *Hemorrhagic shock primes the hepatic portal circulation for the vasoconstrictive*

- effects of endothelin-1*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. 281(3): p. H1075-1084.
120. Paschen, U., *Serial blood sampling from the portal and hepatic vein in conscious unrestrained miniature pigs*. Research in Experimental Medicine, 1986. 186(2): p. 87.
121. Pastores, S.M., D.P. Katz, and V. Kvetan, *Splanchnic ischemia and gut mucosal injury in sepsis and the multiple organ dysfunction syndrome*. Am J Gastroenterol, 1996. 91(9): p. 1697-1710.
122. Persson, J.O., Y. Terelius, and M. Ingelman-Sundberg, *Cytochrome P-450-dependent formation of reactive oxygen radicals: isozyme-specific inhibition of P-450-mediated reduction of oxygen and carbon tetrachloride*. Xenobiotica, 1990. 20(9): p. 887-900.
123. Piskunova, T.S., M.N. Iurova, M.A. Zabezhinskii, and V.N. Anisimov, *[Poly(ADP-ribose)polymerase--the relationships with life span and carcinogenesis]*. Adv Gerontol, 2007. 20(2): p. 82-90.
124. Ploner, F., P. Radermacher, M. Theisen, I.F. Tugtekin, M. Matejovic, A. Stehr, C. Szabo, G.J. Southan, M. Georgieff, U.B. Bruckner, and K. Trager, *Effects of combined selective iNOS inhibition and peroxynitrite blockade during endotoxemia in pigs*. Shock, 2001. 16(2): p. 130-136.
125. Price, J.B., Jr., P.A. McFate, and R.F. Shaw, *Dynamics of Blood Flow through the Normal Canine Liver*. Surgery, 1964. 56: p. 1109-1120.
126. Rappaport, A.M., *Hepatic blood flow: morphologic aspects and physiologic regulation*. Int Rev Physiol, 1980. 21: p. 1-63.
127. Richardson, P.D. and P.G. Withrington, *Liver blood flow. I. Intrinsic and nervous control of liver blood flow*. Gastroenterology, 1981. 81(1): p. 159-173.
128. Roesner, J.P., J. Mersmann, S. Bergt, K. Bohnenberg, C. Barthuber, C. Szabo, G.E. Noldge-Schomburg, and K. Zacharowski, *Therapeutic injection of PARP inhibitor INO-1001 preserves cardiac function in porcine myocardial ischemia and reperfusion without reducing infarct size*. Shock, 2010. 33(5): p. 507-512.
129. Roesner, J.P., D.A. Vagts, T. Iber, C. Eipel, B. Vollmar, and G.F. Noldge-Schomburg, *Protective effects of PARP inhibition on liver microcirculation and function after haemorrhagic shock and resuscitation in male rats*. Intensive Care Med, 2006. 32(10): p. 1649-1657.
130. Sakamoto, M., T. Ueno, M. Kin, H. Ohira, T. Torimura, S. Inuzuka, M. Sata, and K. Tanikawa, *Ito cell contraction in response to endothelin-1 and substance P*. Hepatology, 1993. 18(4): p. 978-983.
131. Saner, F.H., G. Pavlakovic, Y. Gu, N.R. Fruhauf, A. Paul, A. Radtke, S. Nadalin, M. Malago, and C.E. Broelsch, *Does PEEP impair the hepatic outflow in patients following liver transplantation?* Intensive Care Med, 2006. 32(10): p. 1584-1590.
132. Saxena, A., L.H. Wong, P. Kalitsis, E. Earle, L.G. Shaffer, and K.H. Choo, *Poly(ADP-ribose) polymerase 2 localizes to mammalian active centromeres and interacts with PARP-1, Cenpa, Cenpb and Bub3, but not Cenpc*. Human Molecular Genetics, 2002. 11(19): p. 2319-2329.
133. Schmittinger, C.A., *Zur Wirkung von Vasopressin beim unkontrollierten Hämorrhagischen Schock: Eine experimentelle Therapiestudie am Schwein*. 2003.
134. Schraufstatter, I.U., P.A. Hyslop, D.B. Hinshaw, R.G. Spragg, L.A. Sklar, and C.G. Cochrane, *Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(13): p. 4908-4912.
135. Schreiber, V., J.C. Ame, P. Dolle, I. Schultz, B. Rinaldi, V. Fraulob, J. Menissier-de Murcia, and G. de Murcia, *Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1*. Journal of Biological Chemistry, 2002. 277(25): p. 23028-23036.
136. Seltzer, J.L., D.E. Ritter, M.A. Starsnic, and A.T. Marr, *The hemodynamic response to traction on the abdominal mesentery*. Anesthesiology, 1985. 63(1): p. 96-99.
137. Seyde, W.C. and D.E. Longnecker, *Anesthetic influences on regional hemodynamics in normal and hemorrhaged rats*. Anesthesiology, 1984. 61(6): p. 686-698.
138. Shall, S. and G. de Murcia, *Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?* Mutat Res, 2000. 460(1): p. 1-15.

139. Shepherd, A.P. and G.L. Riedel, *Continuous measurement of intestinal mucosal blood flow by laser-Doppler velocimetry*. Am J Physiol, 1982. 242(6): p. G668-672.
140. Shoemaker, W.C., D.R. Boyd, R.S. Corley, J.M. Reinhard, D.A. Dreiling, and A.E. Kark, *Sequential hemodynamic events after trauma to the unanesthetized patient*. Surg Gynecol Obstet, 1971. 132(4): p. 651-656.
141. Shoemaker, W.C., A.B. Peitzman, R. Bellamy, R. Bellomo, S.P. Bruttig, A. Capone, M. Dubick, G.C. Kramer, J.E. McKenzie, P.E. Pepe, P. Safar, R. Schlichtig, J.W. Severinghaus, S.A. Tisherman, and L. Wiklund, *Resuscitation from severe hemorrhage*. Crit Care Med, 1996. 24(2 Suppl): p. S12-23.
142. Short, C.R. and R.D. Stith, *Perinatal development of hepatic microsomal mixed function oxidase activity in swine*. Biochemical Pharmacology, 1973. 22(11): p. 1309-1319.
143. Simbulan-Rosenthal, C.M., D.S. Rosenthal, S. Iyer, A.H. Boulares, and M.E. Smulson, *Transient poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis*. Journal of Biological Chemistry, 1998. 273(22): p. 13703-13712.
144. Sindram, D., R.J. Porte, M.R. Hoffman, R.C. Bentley, and P.A. Clavien, *Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver*. Gastroenterology, 2000. 118(1): p. 183-191.
145. Smith, S., I. Gariat, A. Schmitt, and T. de Lange, *Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres.[comment]*. Science, 1998. 282(5393): p. 1484-1487.
146. Soldani, C. and A.I. Scovassi, *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update*. Apoptosis, 2002. 7(4): p. 321-328.
147. Spiegel, H.U., J. Hauss, K. Schonleben, and H. Bunte, *Theory and methods of local tissue-pO₂ monitoring in experimental angiology*. Angiology, 1987. 38(1 Pt 1): p. 1-12.
148. Szabo, A., P. Hake, A.L. Salzman, and C. Szabo, *3-Aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase, improves hemodynamics and prolongs survival in a porcine model of hemorrhagic shock*. Shock, 1998. 10(5): p. 347-353.
149. Szabo, C. and V.L. Dawson, *Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion*. Trends Pharmacol Sci, 1998. 19(7): p. 287-298.
150. Takei, Y., I. Marzi, W.S. Gao, G.J. Gores, J.J. Lemasters, and R.G. Thurman, *Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat*. Transplantation, 1991. 51(5): p. 959-965.
151. Theisen, M., K. Trager, I. Tugtekin, A. Stehr, F. Ploner, M. Georgieff, P. Radermacher, and M. Matejovic, **Effects of nicotinamide, an inhibitor of PARS activity, on gut and liver O₂ exchange and energy metabolism during hyperdynamic porcine endotoxemia*. Intensive Care Med, 2001. 27(3): p. 586-592.
152. Thiel, M., *Pathophysiologie des Schocks*. Notfall & Rettungsmedizin, 2006. 9(6): p. 509.
153. Thomson, I.A., W. Fitch, D. Campbell, and R. Watson, *Effects of ketamine on liver blood flow and hepatic oxygen consumption. Studies in the anaesthetised greyhound*. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 1988. 32(1): p. 10-14.
154. Thomson, I.A., W. Fitch, R.L. Hughes, D. Campbell, and R. Watson, *Effects of certain i.v. anaesthetics on liver blood flow and hepatic oxygen consumption in the greyhound*. British Journal of Anaesthesia, 1986. 58(1): p. 69-80.
155. Tokics, L., B. Brismar, G. Hedenstierna, and R. Lundh, *Oxygen uptake and central circulation during ketamine anaesthesia*. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 1983. 27(4): p. 318-322.
156. Tomarken, J.L. and B.A. Britt, *Malignant hyperthermia*. Annals of Emergency Medicine, 1987. 16(11): p. 1253-1265.
157. Trauma, C.o., *Advanced trauma life support (ATLS)*. 7 ed. 2004, Chicago: American College of Surgeons.
158. Tremper, K.K., S.J. Barker, S.M. Hufstedler, and M. Weiss, *Transcutaneous and liver surface PO₂ during hemorrhagic hypotension and treatment with phenylephrine*. Critical Care Medicine, 1989. 17(6): p. 537-540.
159. Tweed, W.A., M. Minuck, and D. Mymin, *Circulatory responses to ketamine anesthesia*. Anesthesiology, 1972. 37(6): p. 613-619.

160. van Zon, A., M.H. Mossink, M. Schoester, A.B. Houtsmuller, G.L. Scheffer, R.J. Scheper, P. Sonneveld, and E.A. Wiemer, *The formation of vault-tubes: a dynamic interaction between vaults and vault PARP*. Journal of Cell Science, 2003. 116(Pt 21): p. 4391-4400.
161. Vedder, N.B., B.W. Fouty, R.K. Winn, J.M. Harlan, and C.L. Rice, *Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated with resuscitation from shock*. Surgery, 1989. 106(3): p. 509-516.
162. Vedder, N.B., R.K. Winn, C.L. Rice, E.Y. Chi, K.E. Arfors, and J.M. Harlan, *A monoclonal antibody to the adherence-promoting leukocyte glycoprotein, CD18, reduces organ injury and improves survival from hemorrhagic shock and resuscitation in rabbits*. Journal of Clinical Investigation, 1988. 81(3): p. 939-944.
163. Virág, L., *Poly (ADP-ribosyl) ation in asthma and other lung diseases*. Pharmacological Research, 2005. 52(1): p. 83.
164. Virag, L. and C. Szabo, *The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors*. Pharmacological Reviews, 2002. 54(3): p. 375-429.
165. Vollmar, B., P.F. Conzen, T. Kerner, H. Habazettl, M. Vierl, H. Waldner, and K. Peter, *Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage*. Anesthesia & Analgesia, 1992. 75(3): p. 421-430.
166. Vollmar, B., J. Glasz, R. Leiderer, S. Post, and M.D. Menger, *Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion*. Am J Pathol, 1994. 145(6): p. 1421-1431.
167. Vollmar, B., G. Lang, S. Post, M.D. Menger, and K. Messmer, *[Microcirculation of the liver in hemorrhagic shock in the rat and its significance for energy metabolism and function]*. Zentralbl Chir, 1993. 118(4): p. 218-225.
168. Wang, P., Z.F. Ba, J. Burkhardt, and I.H. Chaudry, *Measurement of hepatic blood flow after severe hemorrhage: lack of restoration despite adequate resuscitation*. American Journal of Physiology, 1992. 262(1 Pt 1): p. G92-98.
169. Watts, J.A., R.M. Grattan, 2nd, B.S. Whitlow, and J.A. Kline, *Activation of poly(ADP-ribose) polymerase in severe hemorrhagic shock and resuscitation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. 281(2): p. G498-506.
170. Wedge, S.R., J.K. Porteous, and E.S. Newlands, *3-aminobenzamide and/or O6-benzylguanine evaluated as an adjuvant to temozolomide or BCNU treatment in cell lines of variable mismatch repair status and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity*. Br J Cancer, 1996. 74(7): p. 1030-1036.
171. Weiskopf, R.B., M.A. Holmes, I.J. Rampil, B.H. Johnson, N. Yasuda, A.G. Targ, and E.I. Eger, 2nd, *Cardiovascular safety and actions of high concentrations of I-653 and isoflurane in swine*. Anesthesiology, 1989. 70(5): p. 793-798.
172. White, P.F., W.L. Way, and A.J. Trevor, *Ketamine--its pharmacology and therapeutic uses*. Anesthesiology, 1982. 56(2): p. 119-136.
173. Wilmore, D.W., C.W. Goodwin, L.H. Aulick, M.C. Powanda, A.D. Mason, Jr., and B.A. Pruitt, Jr., *Effect of injury and infection on visceral metabolism and circulation*. Ann Surg, 1980. 192(4): p. 491-504.
174. Winso, O., B. Biber, and J. Martner, *Effects of hyperventilation and hypoventilation on stress-induced intestinal vasoconstriction*. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 1985. 29(7): p. 726-732.
175. Wray, G.M., C.J. Hinds, and C. Thiernemann, *Effects of inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase activity on hypotension and multiple organ dysfunction caused by endotoxin*. Shock, 1998. 10(1): p. 13-19.
176. Young, J.B. and L. Landsberg, *Catecholamines and intermediary metabolism*. Clinics in Endocrinology & Metabolism, 1977. 6(3): p. 599-631.
177. Yu, S.W., H. Wang, M.F. Poitras, C. Coombs, W.J. Bowers, H.J. Federoff, G.G. Poirier, T.M. Dawson, and V.L. Dawson, *Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor.[see comment]*. Science, 2002. 297(5579): p. 259-263.
178. Zhong, Z., J.J. Lemasters, and R.G. Thurman, *Role of purines and xanthine oxidase in reperfusion injury in perfused rat liver*. J Pharmacol Exp Ther, 1989. 250(2): p. 470-475.

179. Zingarelli, B., S. Cuzzocrea, Z. Zsengeller, A.L. Salzman, and C. Szabo, *Protection against myocardial ischemia and reperfusion injury by 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase*. Cardiovasc Res, 1997. 36(2): p. 205-215.

10 Thesen zur Promotionsschrift

1. Nach einem hämorrhagischen Schock und Volumentherapie kommt es zu Ischämie-Reperfusionsschäden im gesamten Organismus.
2. Insbesondere die Leber ist ein von Ischämie-Reperfusionsschäden betroffenes Organ.
3. Ein Schädigungsmechanismus ist eine Überaktivierung der Poly(ADP)-Ribose-Polymerase (PARP), eines zellulären Wächter- und Reparationsenzym.
4. Nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie ist eine starke Aktivierung von PARP im Lebergewebe zu beobachten.
5. INO-1001 - ein neuer wasserlöslicher PARP-Inhibitor - reduziert die PARP-Aktivierung im Lebergewebe nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion.
6. INO-1001 reduziert den Leberschaden, gemessen an der Freisetzung der Transaminasen, nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion.
7. INO-1001 verbessert die Leberoberflächenoxygenierung.
8. INO-1001 beeinflusst die Leberdurchblutung nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion nicht.
9. INO-1001 beeinflusst das Sauerstoffangebot oder den Sauerstoffverbrauch der Leber nicht.
10. INO-1001 verbessert die Laktatclearance nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion nicht.